



ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA EXPRESSIÓ.

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA EXPRESSIÓ

Noemí Serra Encinas



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

Noemí Serra Encinas

**ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ
DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL
I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA
DE LA SEVA EXPRESSIÓ**

TESI DOCTORAL

dirigida pel Dr. Joan Carles Vallvé Torrente i
pel Dr. Lluís Masana Marin

Departament
de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona
2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

C/Marcel·lí Domingo s/n

Campus Sescelades

43007 Tarragona

Telèfon: 977 55 87 78

Fax: 977 55 8232

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "Estudi genètic d'associació de fibulines i hipertensió arterial i regulació farmacològica de la seva expressió", que presenta Noemí Serra Encinas per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta universitat.

Reus, 25 de Novembre de 2015

Els directors de la tesi doctoral

Dr. Joan Carles Vallvé Torrente

Dr. Lluís Masana Marin

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

Als meus pares, us estimo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

**A la meva petita gran família Javi i Aday,
sou el meravellós motiu pel qual cada dia
em desperto amb un somriure. OQCL**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

ÍNDEX

I.INTRODUCCIÓ	13
1. MALALTIES CARDIOVASCULARS I ARTERIOSCLEROSI	15
2. ESTRUCTURA DE LA PARET VASCULAR	16
3. MATRIU EXTRACEL·LULAR	19
3.1. Composició de la matriu extracel·lular	20
3.1.1. Col·lagen	20
3.1.2. Elastina	21
3.1.3. Fibronectina	22
3.1.4. Fibulines	22
3.1.5. Proteoglicans	23
3.1.6. Altres components de la matriu	24
3.2. Estructura de la matriu extracel·lular	25
3.3. Funcions de la matriu extracel·lular	28
4. REMODELATGE VASCULAR	30
5. ARTERIOSCLEROSI-PLACA D'ATEROMA	35
6. FIBULINES	40
6.1. Estructura de les fibulines	41
6.2. Expressió de les fibulines	44
6.3. Funcions de les fibulines	46
6.4. SNPs de les fibulines associats a malalties	50
7. FUNCIONS DE LA FIBULINA-2	51
8. ESTATINES I PARET VASCULAR	55
9. HIPERTENSIÓ ARTERIAL I PARET VASCULAR	60
10. PAPER DE LES FIBULINES EN EL REMODELATGE VASCULAR I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR	63
11. IMPACTE DE LA HTA I ALTRES FACTORS DE RISC EN EL REMODELATGE VASCULAR I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR	66
12. IMPACTE DE LES ESTATINES I ALTRES FÀRMACS CARDIOVASCULARS EN EL REMODELATGE VASCULAR I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR	68
II.HIPÒTESI	71

III.OBJECTIUS	75
IV.MATERIALS I MÈTODES	79
1. SELECCIÓ I GENOTIPATGE DELS SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS)	81
2. ESTUDI <i>IN VITRO</i>	82
(Efecte de fàrmacs antihipertensius sobre l'expressió de fibulines)	
2.1. Tipus cel·lulars i reactius	82
2.2. Efecte del lisinopril i l'amlodipina sobre les fibulines	83
2.3. Aïllament de RNA	83
2.4. RT-PCR a temps real	84
2.5. Extracció de proteïna	85
2.6. <i>Western blot</i> de proteïnes citoplasmàtiques	85
2.7. Citotoxicitat	86
V.RESULTATS	87
1. ESTUDI 1 (TWO VARIANTS IN THE FIBULIN2 GENE ARE ASSOCIATED WITH LOWER SYSTOLIC BLOOD PRESSURE AND DECREASED RISK OF HYPERTENSION)	89
2. ESTUDI 2 (SIMVASTATIN INCREASES FIBULIN-2 EXPRESSION IN HUMAN CORONARY ARTERY SMOOTH MUSCLE CELLS VIA RHOA/RHO-KINASE SIGNALING PATHWAY INHIBITION)	97
3. RESULTATS ADDICIONALS	119
4. RESUM DE RESULTATS	131
VI.DISCUSSIÓ	137
VII.CONCLUSIONS	151
VIII.REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	155

I.INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

1. MALALTIES CARDIOVASCULARS I ARTERIOSCLEROSI

Les malalties cardiovasculars (MCV) són la principal causa de mortalitat en les societats occidentals avançades^[1]. Segons les prediccions actuals aquestes malalties s'espera que passin a ser la primera causa de mortalitat a nivell mundial en els propers 15 anys, degut a un ràpid creixement en els països en vies de desenvolupament i un augment en la incidència de malalties com la diabetis o l'obesitat^[2].

L'arteriosclerosi és una malaltia complexa i progressiva que normalment afecta a artèries de gran mida (coronàries, aorta, cerebrals i artèries perifèriques). L'arteriosclerosi és la malaltia base subjacent a moltes de les malalties cardiovasculars i consisteix en un engruiximent i pèrdua d'elasticitat de la paret arterial produït per un cúmul de dipòsits de greix, colesterol, teixit fibrós, restes de tipus cel·lulars i d'altres productes sanguinis en la part més interna de l'artèria que poden arribar a reduir o a obstruir el flux sanguini degut a la presència de les anomenades plaques d'ateroma. La lenta evolució de l'arteriosclerosi durant la vida fa que sigui una malaltia asimptomàtica fins el moment en que es manifesta clínicament amb un episodi cardiovascular.

Els estudis epidemiològics dels darrers 50 anys han demostrat un caràcter multifactorial de l'arteriosclerosi^[3]. S'han identificat factors de

risc modificables com la dieta, el tabaquisme o el sedentarisme i factors de risc no modificables com l'edat, el sexe i la història familiar ^[4].

Aquests factors de risc són els responsables dels canvis en la incidència de les MCV en les diferents regions geogràfiques.

2. ESTRUCTURA DE LA PARET VASCULAR

Les artèries són conductes tubulars que transporten la sang des del cor cap a la resta de l'organisme i que de forma genèrica, es componen de tres capes: la capa íntima, la capa media i la capa adventícia.

L'íntima és la capa més interna formada d'una sola capa de cèl·lules endotelials que actua de barrera entre el flux sanguini i l'espai intersticial^[5]. A més de permetre l'intercanvi de nutrients, l'endoteli és un sensor de l'homeòstasi de la sang circulant de manera que intervé en molts processos tals com; la vasodilatació i vasoconstricció, inflamació, coagulació de la sang, entre d'altres^[6]. La disfunció de l'endoteli es considera com un procés clau en l'inici del desenvolupament de la lesió arterioscleròtica.

La capa media és la capa intermitja, i depenent del tipus de vas i del seu gruix, conté un nombre variable de capes de cèl·lules musculars llises (CML) encarregades de regular el to muscular del vas^[7]. A més, és la responsable de donar elasticitat al vas mitjançant la presència d'un nombre variable de fibres elàstiques.

L'adventícia és la capa més externa i està formada per fibroblasts, teixit nerviós i, en el cas de les grans artèries, s'hi troben uns petits vasos anomenats *vasa vasorum*^[7] que s'encarreguen de nodrir els components d'aquestes artèries.

Els límits entre les diferents capes estan definits de forma genèrica per una làmina elàstica interna que separa la capa íntima de la media i una làmina elàstica externa que separa la capa media de l'adventícia. L'especialització dels diferents tipus d'artèries fa que en ocasions aquestes làmines estiguin poc definides.

La xarxa vascular és una xarxa jeràrquica de tres tipus principals de vasos sanguinis, artèries, venes i capil·lars que es caracteritzen per la localització, mida, funció i composició estructural^[5].

Segons la seva funcionalitat podem trobar 3 tipus majoritaris d'artèries que presenten especialitzacions en la seva estructura.

Les grans artèries elàstiques o conductores, com per exemple l'aorta, són les que presenten la paret vascular més gruixuda. Aquestes artèries contenen una capa media formada per una successió de làmines elàstiques disposades concèntricament entre les quals s'hi troben disposades les CML. El nombre de làmines està relacionat amb la mida i la posició anatòmica de l'artèria. En aquestes artèries la làmina elàstica interna i l'externa són difícils de distingir degut al gran component

elàstic. El predomini d'aquest component permet funcionar aquestes artèries com a bomba subsidiària del cor dilatant-se durant la sistole i contraient-se durant la relaxació ventricular i mantenint d'aquesta forma un pols continu i pulsàtil ^[8]. Una característica important d'aquestes artèries és la presència a l'adventícia d'un gran nombre de *vasa vasorum*. El *vasa vasorum* són petits vasos sanguinis que des de l'adventícia creixen cap a la meitat externa de la media irrigant i nodrint les parets d'aquests grans vasos ^[7]. Aquests petits i fràgils vasos juguen un paper clau en el desenvolupament de l'arteriosclerosi^[9-12], com detallarem més endavant.

Les artèries musculars o de distribució són les encarregades de distribuir la sang cap als diferents òrgans del cos. Tenen menor diàmetre que les artèries elàstiques i en proporció la capa muscular de la seva paret és més nombrosa. Les làmines elàstiques interna i externa estan ben definides i són artèries més innervades ja que són les responsables del manteniment del to vascular de l'organisme.

Les arterioles o vasos de resistència són les artèries de menor calibre i són fonamentals per regular el flux sanguini corporal. El seu funcionament es deu a la contracció variable del múscul llis de la seva paret fet que permet al vas conferir major resistència al flux sanguini^[8] i ajudar a regular la pressió arterial i també regular la quantitat de sang que entra a cada òrgan.

Els diferents components detallats anteriorment de la paret arterial no es troben aïllats uns dels altres sinó estructurats i englobats en l'anomenada matriu extracel·lular (MEC).

3. MATRIU EXTRACEL·LULAR

La MEC és un dels constituents principal de la paret vascular, és una estructura tridimensional de proteïnes, organitzada en forma de xarxa i que és clau per l'estructuració i la regulació de la funcionalitat dels teixits i de la paret vascular^[13, 14]. La MEC és una estructura dinàmica que varia en funció del calibre del vas^[5, 15]. Rep el nom de membrana basal quan es troba situada entre l'endoteli i la lamina elàstica interna de la paret vascular i de vegades es pot trobar anomenada com a matriu intersticial quan es troba a la resta del vas^[13, 15].

Genèricament, la MEC de la paret arterial es compon de diferents tipus de molècules. Les estructurals, com ara col·làgens, fibulines i elastina que són les responsables de formar una xarxa que connecta la matriu a les cèl·lules circumdants^[16, 17] i que li proporciona elasticitat^[18]. Les adhesives com la fibronectina, encarregada d'unir el col·lagen amb proteïnes de superfície cel·lular i de participar en canvis en el citoesquelet que faciliten el moviment cel·lular en la MEC o la laminina encarregada d'unir la làmina basal. Trobem també a la MEC un component glicoproteic important entre el que destaca els proteoglicans que a través de la seva alta capacitat de retenció d'aigua, proporcionen turgència a la matriu i

l'estabilitzen organitzant les xarxes de col·lagen^[19]. Els proteoglicans també són els responsables d'emmagatzemar factors de creixement i citocines i de mantenir una filtració selectiva^[19], i tenen un paper important en les primeres etapes de la lesió arterioscleròtica. Altres glicoproteïnes que s'uneixen a la MEC la doten de propietats addicionals, com per exemple les integrines que promouen l'adhesió cel·lular i la senyalització^[14].

3.1. Composició de la matriu extracel·lular

3.1.1. Col·lagen

El col·lagen és una molècula proteica que forma les anomenades fibres de col·lagen, que estan presents en quantitat variable en quasi tots els tipus de teixit conjuntiu. Les fibres de col·lagen estan formades per fibril·les i són unes estructures que proporcionen a la paret vascular flexibilitat i resistència a la tensió.

Els col·làgens són una gran família de proteïnes, de les quals se'n coneixen 27 tipus. Es componen d'aproximadament 42 cadenes polipeptídiques diferents^[20], estructurant-se en tres cadenes alfa superenrotllades, una al voltant de l'altra, formant una triple hèlix que dona l'estabilitat a les molècules de col·lagen^[13]. Aquesta estructura confereix a la fibra de col·lagen una alta resistència a la tracció i controla la seva extensibilitat.

Els tipus de col·làgens més abundants a la MEC vascular són els I, III, IV, V i VI^[21]. Els col·làgens tipus IV i VI estan localitzats principalment a les membranes basals^[22] mentre que el tipus I i III es localitzen principalment a la matriu intersticial del vas. El col·lagen tipus III és el que contribueix més a l'extensibilitat i elasticitat dels vasos^[23]. El col·lagen tipus V inicia la formació de fibril·les de col·lagen^[24], la manca o deficiència en aquest col·lagen produeix una disminució de la rigidesa vascular^[25].

3.1.2. Elastina

L'elastina és una proteïna estructural que forma part de la MEC i és el component majoritari de les fibres elàstiques^[26]. Està constituïda per moltes unions, tipus hèlix alfa, de molècules solubles de tropoelastina mitjançant una reacció catalitzada per la lisil oxidasa.

L'elastina és una molècula distensible amb una baixa resistència a la tracció que funciona com un dipòsit elàstic i distribueix la tensió uniformement a través de la paret aòrtica a les fibres de col·lagen^[5]. La gran elasticitat que presenta es deguda a un elevat nombre d'aminoàcids poc comuns com la desmosina i la isomdesmosina les quals formen uns enllaços creuats que li atorguen un grau d'elasticitat que li permet estirar-se fins un 150% de la seva llargada abans de trencar-se^[26].

L'elastina també presenta una seqüència RGD (Arg-Gly-Asp) que li permet adherir-se a altres proteïnes de matriu. Aquesta seqüència, identificada pel codi de la lletra que identifica cada aminoàcid, conté tres aminoàcids àcids que actuen de lligam de proteïnes carregades amb una seqüència de tres cations. La seqüència RGD és característica de les proteïnes d'adhesió^[27].

3.1.3. Fibronectina

La fibronectina és una glicoproteïna d'adhesió cel·lular i multifuncional. Està codificada per un sol gen , però un *splicing* alternatiu permet la formació de múltiples isoformes^[28]. Presenta dues subunitats molt grans unides per ponts disulfur i cada subunitat està formada per diversos dominis globulars, els quals li confereixen certes característiques, que li permeten exercir aquestes diferents funcions segons la regió on es troba localitzada. Com a molècula d'adhesió presenta una seqüència RGD.

3.1.4. Fibulines

Les fibulines són glicoproteïnes extracel·lulars molt conservades evolutivament, formades per una família de 8 components (fibulina-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8)^[29], que han estat descobertes fa relativament poc temps.

Les trobem en les membranes basals i les fibres elàstiques participant en l'estructuració de la MEC.

Estan formades per una gran varietat de mòduls agrupats en els dominis I, II i III^[30].

El domini I representa el N-terminal i és variable entre els membres de la família.

El domini II representa la part central de la proteïna, conté un nombre variable de mòduls tipus factor de creixement epidèrmic (EGF) estructurats en forma de tàndems. Molts d'aquests mòduls contenen seqüències consens d'unió a calci i és coneixen com mòduls tipus (cbEGF).

En el domini III, anomenat mòdul tipus fibulina, trobem un domini globular C-terminal i una sèrie de motius d'unió a calci tipus EGF. Aquest domini es troba altament conservat i és específic de les fibulines^[30,31]. Més endavant analitzarem les fibulines amb profunditat.

3.1.5. Proteoglicans

Els proteoglicans són un component important de la MEC, són macromolècules altament glicosilades i estan formades per un cor proteic unit covalentment amb una o més cadenes de glicosaminoglicans (GAGs)^[13].

Aquestes cadenes de GAGs són llargs polímers de carbohidrats lineals que estan carregats negativament en condicions fisiològiques, a causa de la presència de grups sulfat i de grups d'àcid urònic. Degut a la carga negativa i a la conformació d'aquests GAGs, els proteoglicans poden interactuar amb una gran varietat de macromolècules^[32].

En la MEC, podem destacar una família de proteoglicans anomenats petits proteoglicans rics en leucina, que poden unir-se a altres constituents de la MEC i contribuir a la infraestructura de la paret vascular participant en les interaccions proteïna-proteïna amb col·lagen, glicoproteïnes i components de la membrana basal^[33, 34].

3.1.6. Altres components de la matriu

A la MEC també podem trobar altres proteïnes com l'àcid hialurònic, fibrilina, tenascina, laminina, entactina, vitronectina, integrines o immunoglobulines que li confereixen les característiques necessàries per dur a terme una gran varietat de funcions.

L'àcid hialurònic és un GAG aniònic i no sulfatat àmpliament distribuït en la MEC^[35]. Quan monòmers del proteoglicà agregat envolten l'àcid hialurònic, es formen grans agregats carregats negativament que permeten absorbir gran quantitat d'aigua, dotant a la matriu d'una gran resistència a la compressió^[36]. A més, l'àcid hialurònic també contribueix a la hidrodinàmica dels teixits, al moviment i proliferació cel·lular, i participa en les interaccions superficials de la cèl·lula.

La fibrilina és una glucoproteïna que s'uneix a l'elastina i és essencial per la formació de fibres elàstiques^[37].

La tenascina, la laminina i l'entactina són proteïnes adhesives associades a col·lagen, proteoglicans i fibronectina formant part de les membranes basals. I també modulen interaccions matriu-cèl·lula i funcions cel·lulars juntament amb les integrines i immunoglobulines presents en la MEC^[38, 39].

3.2. Estructura de la matriu extracel·lular

La matriu està composta per una xarxa de fibres proteïques immersa en una substància fonamental amorfa gelatinosa (Figura 1). Les fibres proteïques estan formades per col·lagen, elastina, fibronectina i fibulines^[5] i la substància fonamental amorfa per proteoglicans i àcid hialurònic.

Els col·làgens I i III són la base estructural de la MEC, mantenen la integritat estructural i sostenen la resta de components cel·lulars i no cel·lulars del teixit^[19].

La resta de proteïnes de la MEC es troben ancorades en aquesta base de col·làgens fibril·lars. El col·lagen de tipus III és un component important dels teixits intersticials dels vasos sanguinis^[17]. Un tret característic d'aquest, és l'extensibilitat que li proporciona als teixits, i que

pot contribuir a l'elasticitat, una propietat que està connectada únicament a aquest tipus de col·lagen^[16].

El col·lagen tipus VI es troba principalment en les membranes basals i forma una estructura que s'associa amb microfibrilles de fibril·lina per connectar les làmines elàstiques a la membrana basal^[8].

Una correcta estructuració de la MEC està basada també en una correcta estructuració de l'elastina i de les fibres elàstiques que permeten un manteniment òptim de l'elasticitat vascular. Diferents molècules de tropoelastina s'uneixen en estructura hèlix alfa per formar l'elastina, i un cop formada aquesta es disposa sobre un entramat en forma de beina format per microfibrilles de fibril·lina^[36]. Per la correcta unió d'aquests components és necessària la participació de 35 proteïnes, entre les quals trobem les fibulines^[40]. Específicament, la fibulina-1 es troba associada al nucli d'elastina^[41]; la fibulina-2 i la fibulina-4 es troben localitzades en la interfase entre les microfibrilles i el nucli d'elastina^[42, 43]; la fibulina-3 està unida al precursor primari d'elastina^[30], i la fibulina-5 connecta les microfibrilles elàstiques amb el citoesquelet a través de les integrines^[44, 45]. Donada la seva associació amb les fibres elàstiques, aquests cinc membres de les fibulines es coneixen com fibulines elastogèniques^[46].

Però les fibulines també participen en l'estructuració de la MEC interactuant amb altres proteïnes de la matriu. Aquestes interaccions estableixen estructures supramoleculares, fan de pont entre cèl·lules de la matriu i juguen un paper important en diverses funcions^[11].

Un altre dels components de la MEC que participa en la seva estructuració és la fibronectina, aquesta glicoproteïna té una funció adherent, el seu paper és fer de pont i facilitar l'adhesió entre cèl·lules i entre elles i les fibres de col·lagen^[22].

Finalment, tots aquests components proteics de la MEC que formen una xarxa fibrosa estan immersos en un gel amorf format per la unió de proteoglicans i àcid hialurònic^[5]. Els proteoglicans tenen una proteïna filamentosa en el seu centre a la qual si uneixen els GAGs, originant estructures plomoses. Aquestes estructures quan s'uneixen a l'àcid hialurònic formen unes estructures moleculars molt complexes^[17] i hidròfiles, que retenen molta aigua i són les responsables de la seva textura gelatinosa.

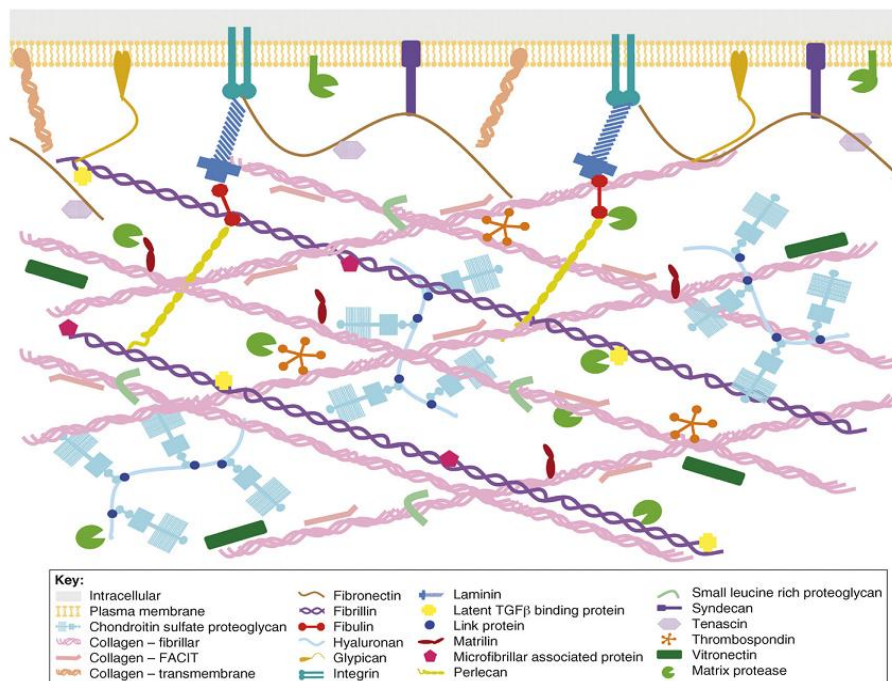


Figura1. Estructura de la matriu extracel·lular.

Julie Huxley-Jones et.al *Drug discovery today* · Volume 13, (15/16) · August 2008

3.3. Funcions de la matriu extracel·lular

Encara que al principi es considerava merament com un sistema de suport per a les cèl·lules dins del teixit, s'ha demostrat que la MEC és una estructura activa i dinàmica amb un paper fonamental en la regulació de la funció vascular en condicions normals i patològiques^[47-53].

La MEC li proporciona a la paret vascular una gran resistència a la ruptura i la capacitat d'emmagatzemar una gran quantitat d'energia

elàstica, dues característiques importants de les artèries elàstiques pel seu correcte funcionament.

La MEC també permet la migració cel·lular i la difusió de molècules hidrosolubles com serien els ions sodi, potassi i calci, i presenta una gran resistència a la compressió, aquestes funcions les pot realitzar per la capacitat de retenir aigua que presenten les estructures hidròfiles formades pels proteoglicans i l'àcid hialurònic.

La MEC conté diferents tipus de receptors cel·lulars com ara integrines, immunoglobulines i selectines^[54-56]. Aquests receptors permeten l'adhesió de cèl·lules i diferents proteïnes de matriu i la senyalització intracel·lular resultant regula processos cel·lulars com ara la proliferació, la supervivència, la diferenciació i l'expressió gènica^[17, 53, 57].

La MEC, per tant, és de suprema importància en la funció dels teixits i les variacions que es poden produir en els seus components, com per exemple l'expressió d'isoformes de proteïnes o la relació entre els components individuals, contribueixen a diferències en la seva organització i estructura^[58].

Com veurem més endavant, el dany als components de la MEC contribueix al desenvolupament de malalties vasculars. Components tals com el col·lagen, l'elastina i els proteoglicans experimenten fragmentació o alteracions fisicoquímiques durant l'aterogènesi. La degradació química

o enzimàtica de proteïnes de la MEC pot canviar les seves propietats originals promovent d'aquesta manera la remodelació de la MEC i la patogènesi de la malaltia vascular^[53].

4. REMODELATGE VASCULAR

El concepte de remodelació en un sentit ampli i general es caracteritza per la resposta de la vasculatura a estímuls inflamatoris, metabòlics i hemodinàmics nocius. Inicialment és un procés funcional, compensatori i adaptatiu a la natura però, si persisteix, progressa i esdevé patogen produint una sèrie de canvis estructurals que comencen i continuen en la mateixa vasculatura^[59].

La remodelació no només implica canvis en la matriu i en cèl·lules intersticials sinó també respostes de les cèl·lules cardiovasculars, endotelials i musculars llises.

Per mantenir la vasculatura en estat òptim, la MEC es regenera en una remodelació normal, en la qual les proteïnes velles o danyades són reemplaçades per proteïnes noves. Aquest procés de remodelació o regeneració normal de la MEC queda alterat en condicions patològiques com l'arteriosclerosi o en processos inflamatoris^[60, 61] i les proteïnes originals de la MEC es substitueixen per diferents constituents de la matriu i en conseqüència, la composició i qualitat de la matriu es troba alterada^[59].

Les proteïnes de la matriu interactuen amb diverses cèl·lules vasculars a través de receptors de superfície, aquestes interaccions induïxen la síntesi de novo de noves cèl·lules vasculars de diverses proteïnes de matriu, durant el desenvolupament o durant la remodelació dels vasos^[53]. En condicions patològiques, les proteïnes de la matriu vascular es troben sotmeses a un procés proteolític produint-se uns fragments bioactius que influeixen en la remodelació. Un *splicing* alternatiu en les cèl·lules vasculars de naturalesa patològica pot conduir a la producció de proteïnes de matriu incapaces de mantenir l'homeòstasi, el que porta a un augment de la rigidesa dels vasos sanguinis^[53].

La rigidesa arterial pot estar associada a modificacions de les propietats elàstiques intrínseques dels biomaterials de la paret (endoteli anormal i desorganitzat, augment de col·lagen, elastina fragmentada i disminuïda^[62-71] infiltració de cèl·lules musculars, infiltració de macròfags, infiltració de cèl·lules mononuclears, augment de metal·loproteïnases (MMPs) , augment del TGF- β (*transforming growth factor*), de molècules d'adhesió intercel·lular (ICAM) i de citocines)^[64, 72] o al gruix i/o radi de la paret, és a dir, al remodelatge arterial^[73]. Aquest últim és la resposta als canvis de les forces mecàniques, com ara la tensió de cisallament que actua sobre l'endoteli i la tensió cíclica circumferencial que afecta a l'endoteli i CML.

La distensibilitat de la paret del vas depèn de la situació de dos proteïnes estructurals principals: col·lagen i elastina^[64]. Normalment, hi ha un equilibri estrictament regulat entre la síntesi i la degradació d'aquestes

dues proteïnes. Es produeixen anomalies en aquest sistema regulador produïts per canvis on el col·lagen es troba sobre expressat i la síntesi d'elastina està debilitada^[74]. Un excés de col·lagen en la paret vascular condueix a la fibrosi del vas i incrementa la rigidesa. Aquest excés es pot produir per la lisil oxidasa, un mecanisme de fibrosi tissular, on l'augment de l'expressió d'aquest enzim augmenta l'entrecreuament del col·lagen i la seva rigidesa^[53], o per un augment del TGF- β , involucrat en el dipòsit de col·lagen a través de l'estimulació de la síntesi de MEC i la reducció de la seva degradació, donant lloc a una disminució del diàmetre luminal^[75]. A més, l'augment de la pressió luminal (com en la hipertensió) també tendeix a afavorir la producció de col·lagen a expenses d'elastina^[76].

També es coneix que els productes finals de glicació avançada (AGE) milloren el contingut de col·lagen. Aquests productes es produeixen per la glicació no enzimàtica de proteïnes, que formen enllaços estables i irreversibles amb proteïnes del teixit com el col·lagen^[77, 78]. Quan aquesta reticulació es dona, el col·lagen resultant és més rígid i resistent^[77, 79] i li confereix al teixit una major resistència a la proteòlisi enzimàtica, una disminució de la taxa de degradació i un augment de la producció de MEC creant entrecreuament amb proteïnes extracel·lulars. De la mateixa manera, l'elastina també és sensible a l'entrecreuament amb AGE. La contribució de l'elastina a la matriu de la paret del vas es troba reduïda constantment des de l'inici de la glicació^[80, 81]. Diversos estudis han demostrat que els AGE afecten la funció endotelial disminuint l'òxid

nítric (NO) i augmentant la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), especialment peroxinitrit^[82]. També es coneix la rellevància dels AGE en l'activació de les vies de l'estrès i resposta inflamatòria, induint l'expressió de p12 (ras), NFκ-B (*factor nuclear kappa B*), factors de creixement, ICAM i la generació de citocines i de ROS. Tots aquests canvis afecten la rigidesa vascular a través de l'activitat de MMP o de la disfunció endotelial^[83-88].

La cèl·lula endotelial, situada en la interfície entre els vasos sanguinis i els teixits, està preparada per detectar en el seu entorn el medi ambient i les variacions de la funció vascular i d'aquesta manera mantenir l'homeòstasi i poder acollir defenses contra diversos invasors microbians i possibles danys^[85]. Les cèl·lules endotelials actuen com sensors del medi vascular induint respostes a canvis hemodinàmics locals i senyals químiques circulants. Els mediadors alliberats per les cèl·lules endotelials al seu entorn, modulen la funció de les CML subjacents afectant d'aquesta manera la remodelació vascular^[59].

La tensió de cisallament laminar de les artèries en condicions normals, desencadenen unes pautes a partir de cèl·lules endotelials que mitiguen els efectes de factors de risc com el colesterol de lipoproteïnes de baixa densitat (cLDL) i eviten la vasoconstricció alliberant NO, el factor relaxant derivat de l'endoteli. Aquests efectes inclouen inflamació i expressió gènica pro trombòtica. En canvi, si els fluxos es troben pertorbats, impedeixen tals funcions ateroprotectores activant el factor

de transcripció pro inflamatori NF κ -B per provocar el reclutament de cèl·lules inflamatòries i deteriorant l'activitat vasodilatadora. La conseqüent acumulació de leucòcits en l'íntima arterial és el pas previ per la formació de cèl·lules escumoses, a causa de l'embolcallament d'aquests per lipoproteïnes modificades, que s'han anat acumulant en l'íntima per la seva exposició a un excés de LDL^[89].

Les CML, a diferència de les cèl·lules endotelials, no són sensibles a la tensió de cisallament luminal però experimenten deformació circumferencial cíclica causada per pulsacions arterials. Aquesta força incrementa la síntesi de proteoglicans per CML i d'aquesta manera augmenta la retenció de LDL a l'íntima^[90] afavorint la modificació oxidativa en aquest entorn. Les CML a l'íntima, activades per citocines inflamatòries produïdes pels macròfags poden també produir més col·lagen, donant lloc a fibrosis arterial, característica en l'envelliment i la hipertensió, activant així l'alliberament de proteïnases que degraden la matriu com per exemple, les MMPs^[59]. Aquests enzims poden remodelar l'estructura arterial de la MEC, afectant la producció de col·lagen dèbil i les fibres d'elastina més desgastades, incloent l'elastina de la membrana elàstica externa que forma el perímetre exterior de l'artèria.

Aquesta remodelació, alenteix l'expansió luminal (creixement cap a l'exterior del vas) del creixement de l'ateroma, preservant d'aquesta manera el diàmetre del lumen de l'artèria i mantenint constant el flux^[91]. En última instància, la placa en creixement pot superar aquesta

remodelació compensatòria de la paret, la qual cosa permet a l'ateroma expandir-se cap al lumen i causar estenosi.

La remodelació arterial, sovint comença amb la funció endotelial alterada, té moltes cares i varia al llarg de la història de la vida d'un ateroma o un vas sotmès a hipertensió crònica. El control de la pressió arterial pot limitar el remodelat advers, el que redueix el risc d'accident cerebrovascular i l'agreujament de l'arteriosclerosi.

L'ús d'estatines, una classe de medicaments amb efectes directes anti-inflamatoris més enllà de la reducció de LDL, pot limitar la progressió de la placa i, en alguns casos, pot retrocedir les lesions i canvis característics de la placa associats amb ruptura i trombosis^[92].

5. ARTERIOSCLEROSI-PLACA D'ATEROMA

L'arteriosclerosi es caracteritza per la formació de lesions arterioscleròtiques (ateromes). Els ateromes són engruiximents asimètrics que es produeixen en l'íntima i provoquen una resposta inflamatòria de la paret arterial la qual desencadena una sèrie de respostes moleculars i cel·lulars altament específiques.

L'arteriosclerosi esdevé en 4 etapes^[93-96]:

- Disfunció endotelial, esdeveniment clau que dona pas a l'arteriosclerosi com ja hem comentat. En aquest inici de la lesió les

cèl·lules endotelials arterials comencen a expressar sobre la seva superfície molècules d'adhesió selectives, que s'uneixen a diverses classes de leucòcits. Els monòcits i limfòcits T, un cop els monòcits s'han adherit a l'endoteli, migren entre les cèl·lules endotelials per localitzar-se en l'íntima on es dipositen i es transformen en macròfags que seran estimulats per citocines i podran absorbir lipoproteïnes oxidades, especialment LDL oxidades que hauran estat retingudes pels proteoglicans de la MEC. Al quedar retingudes dins de l'íntima, les lipoproteïnes queden separades dels antioxidants que es troben en el plasma i aquest fet afavoreix la seva oxidació. Les LDL oxidades o modificades indueixen una resposta inflammatòria local que és la responsable dels següents passos en el desenvolupament de la lesió.

- Estria de greix: és la lesió més incipient caracteritzada per lesions linears groguenques visibles a l'íntima arterial que corresponen a dipòsit intracel·lular de colesterol en regions riques en cèl·lules inflamatòries. Es forma com a conseqüència de la captació de LDL oxidades per part dels macròfags situats en l'íntima i donen lloc a les cèl·lules escumoses riques en gotes lipídiques. Els macròfags produeixen interleuquina-1 i factor de necrosi tumoral que augmenten l'adhesió de leucòcits i diverses quimiocines, incloent la proteïna quimiotàctica de monòcits (MCP-1) que reclutarà major nombre de leucòcits a la placa. Els limfòcits T també seran reclutats cap a l'íntima per molècules quimioatracients, i l'intercanvi

d'informació entre aquests i els macròfags activaran la resposta immune cel·lular, característica principal d'estat d'inflamació crònic. Els macròfags produeixen ROS que també contribueixen a l'oxidació de les LDL en la lesió i fabriquen factors de creixement. En la zona afectada s'hi adhereixen les plaquetes, i aquestes al activar-se també alliberaran factors de creixement que juntament amb els macròfags i les cèl·lules escumoses causaran la migració de les CML.

- Lesions avançades i complicacions. La lesió primària progressa cap a una lesió més complexa caracteritzada per la migració de les CML. Aquestes migren des de la media cap a l'íntima on es disposen en la MEC, fet que converteix l'estria grassa en un ateroma fibrós madur i contribueix al creixement de la lesió arterioscleròtica. Aquestes lesions fibròtiques tenen una capa fibrosa majoritàriament formada per CML i diferents components de la MEC com col·làgens i fibulines, i un cor ric en lípids. Les CML sintetitzen molècules de la MEC com el col·lagen, proteoglicans i fibulines, que estableixen les plaques arterioscleròtiques tot i que aquestes cèl·lules poden entrar en apoptosi induïda per cèl·lules immunes e inflamatòries. Per tant l'ateroma en evolució es troba en un estat inflamatori amb macròfags, limfòcits, cèl·lules endotelials i CML, que expressen o aporten una gran varietat de factors capaços de modificar la funció cel·lular. En aquesta fase es depositen lípids tant dins (de macròfags i CML) com fora de les cèl·lules. La persistència de tot aquest procés inflamatori i fibroproliferatiu condueix a la formació de la placa

d'ateroma que pot romandre estable o inestable. L'estabilitat o vulnerabilitat de la placa ve determinada per la mida de la placa, la composició del nucli lipídic, el gruix de la capa fibrosa que envolta el nucli i la inflamació en l'interior de la placa^[97]. Una placa estable és la que presenta una càpsula fibrosa gruixuda i amb un nucli o bé pobre en colesterol o bé format per colesterol menys oxidat, característiques que donen lloc a una menor resposta inflamatòria en la placa. Aquest tipus de plaques no presenten complicacions clíniques fins passades varies dècades. D'altra banda, una placa d'ateroma inestable és aquella que presenta una capa fibrosa prima amb un nucli ric en colesterol o format per colesterol molt oxidat que indueixen a una resposta inflamatòria crònica en la placa. Les citocines alliberades per macròfags i per limfòcits T en el procés inflamatori provoquen l'apoptosi de CML que són les responsables de sintetitzar col·lagen, el principal component de la capa fibrosa, i generant d'aquesta manera una capa menys gruixuda i més dèbil. Aquestes plaques també presenten secreció de MMPs que degraden la coberta fibrosa, per part dels macròfags, i neovascularització que contribueixen a una major debilitació de la placa. Aquest fet es deu a que els *vasa vasorum* originals que són petits vasos fisiològics que es troben distribuïts en posició longitudinal en l'adventícia dels grans vasos comencen a recórrer el vas en posició transversal i travessen l'adventícia fins arribar a la capa íntima, causant la desestabilització de la placa. L'endoteli d'aquests microvasos és molt fràgil, així que, al travessar l'adventícia, la media i l'íntima, aquests es trenquen causant

micro hemorràgies. Hi ha l'alliberació de glòbuls rojos que són font de colesterol lliure i aquest colesterol augmenta el procés inflamatori i accelera la formació de plaques vulnerables. Llavors la vulnerabilitat de la placa facilita el seu trencament alliberant el contingut cap a la llum del vas on s'activa l'adhesió plaquetària i la conseqüent formació del trombus.

- Trencament de la placa i trombosis. Si el procés inflamatori es manté i els factors de risc persisteixen, el nucli necròtic continua creixent i provoca la degradació de la MEC i la coberta fibrosa per les MMPs. Les citocines limiten la síntesi del col·lagen provocant la disminució de capa fibrosa i provocant que aquesta sigui susceptible al trencament. Quan la placa es trenca, el factor tissular entra en contacte amb els components de la sang activant la cascada de coagulació on la trombina activa l'agregació de plaquetes, les quals interactuen amb proteïnes del plasma i permeten la polimerització del fibrinogen formant-se un trombus. Aquest obstruirà la llum del vas donant lloc a les manifestacions clíniques pròpies de l'arteriosclerosi.

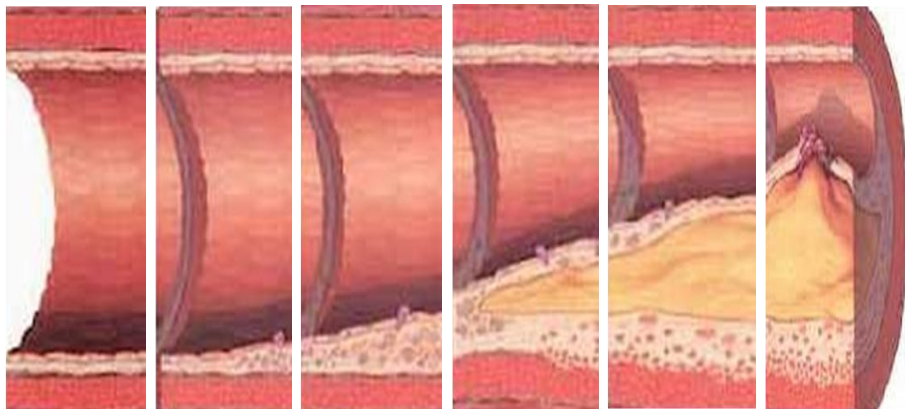


Figura 2. Evolució d'una artèria durant els processos patològics de l'arteriosclerosi. Adaptada de McGill HC Jr, ed. The geographic pathology of atherosclerosis. Lab. Invest. 1968;18 (theme issue):465-653.

6. FIBULINES

Les fibulines són una família de glicoproteïnes extracel·lulars molt conservades evolutivament^[18, 45], localitzades en les membranes basals i en les fibres elàstiques^[44, 98-100] i que participen en l'estructuració de la MEC^[18, 45].

Des del descobriment el 1990 del prototip fibulina-1, s'han identificat en mamífers set tipus de fibulines que s'anomenen correlativament fibulina-2, -3, -4, -5, -6 i -7^[46, 101, 102]. Recentment, durant la búsqueda dels ortòlegs del gen de la fibulina-7, s'ha descobert una nova seqüència no descrita que s'ha anomenat fibulina-8, tot i que fins ara no s'ha descrit expressió en humans^[102, 103].

Estudis genètics en malalties hereditàries i l'ús d'animals d'experimentació han mostrat la importància de les fibulines en processos de desenvolupament com elastogènesi^[44, 99, 104] o la formació vascular^[18] i en diverses patologies com la degeneració de la màcula, MCV o càncer^[30, 102].

Les fibulines a més d'estructurar la MEC, s'ha descrit que poden modular processos com el creixement cel·lular, la diferenciació^[102], l'angiogènesi i el creixement tumoral^[30]. Els mecanismes moleculars pels quals es produeixen aquests efectes encara no es coneixen amb exactitud.

6.1. Estructura de les fibulines

Com hem comentat anteriorment les fibulines estan formades per diferents mòduls agrupats en els dominis I, II i III. El domini I representa la part N-terminal i és variable en els diferents membres de la família. El domini II és la part central de la proteïna i conté un nombre variable de mòduls tipus EGF. I el domini III és la part C-terminal i és específic de la família de les fibulines^[18, 42, 45, 103, 105].

Segons la llargada i dominis estructurals podem dividir les fibulines en dos subgrups (Figura 4). El primer subgrup el formen la fibulina-1 i la fibulina-2, que són més grans i comparteixen estructuralment tres mòduls anafilatoxina en el domini I^[30] i nou mòduls tipus EGF en el domini II, alguns dels quals són mòduls tipus cbEGF. Addicionalment,

aquestes fibulines es diferencien en la regió N-terminal, on la fibulina-2 presenta un domini lliure de cisteïnes d'uns 250 aminoàcids per acabar l'estructura amb un domini ric en cisteïnes d'uns 150 aminoàcids. En el mòdul III un *splicing* alternatiu en el gen de la fibulina-1 produeix quatre variants (A,B,C i D). En humans, les variants A i la B s'expressen a nivells baixos^[106-108]. D'altra banda en la fibulina-2 el tercer mòdul tipus EGF pot ser present o absent com a conseqüència d'un *splicing* alternatiu produint dues variants de la fibulina-2 (A i B). Ambdues variants es troben en humans i ratolins, però es desconeix si aquestes proteïnes tenen funcions diferents^[108].

El segon subgrup el formen la resta dels membres, que engloben des de la fibulina-3 fins la fibulina-7. Els tres primers membres, les fibulines-3, -4 i -5, són les més petites i les més conservades evolutivament en els vertebrats. Estructuralment aquestes fibulines no presenten domini I, i el domini II està format per cinc mòduls cbEGF precedits d'un mòdul tipus EGF atípic que conté una seqüència d'aminoàcids, de 28 a 88 residus, entre la quarta i la cinquena cisteïna. Un *splicing* alternatiu en la fibulina-3 dóna lloc a cinc variants, les quals tenen una absència total o parcial del domini I^[109]. A dues d'aquestes variants els hi manca el pèptid senyal i el seu nivell d'expressió és molt baix. També ha estat descrita una variant de la fibulina-4 que no conté el pèptid senyal degut a un *splicing* alternatiu^[110]. D'altra banda, la fibulina-6 presenta un domini tipus factor de *Von Willebrand* en el domini N-terminal seguit per una formació de tàndems de 40 mòduls d'immunoglobulina C-2 i sis repeticions de

mòduls de trombospondina tipus I ^[43] en el domini I precedit de vuit mòduls tipus cbEGF en el domini II. L'últim membre d'aquest segon subgrup és la fibulina-7, caracteritzada per la presència en el domini I d'un mòdul anomenat sushi^[30] que es troba involucrat en interaccions proteïna-proteïna, i un domini II amb tres mòduls cb-EGF.

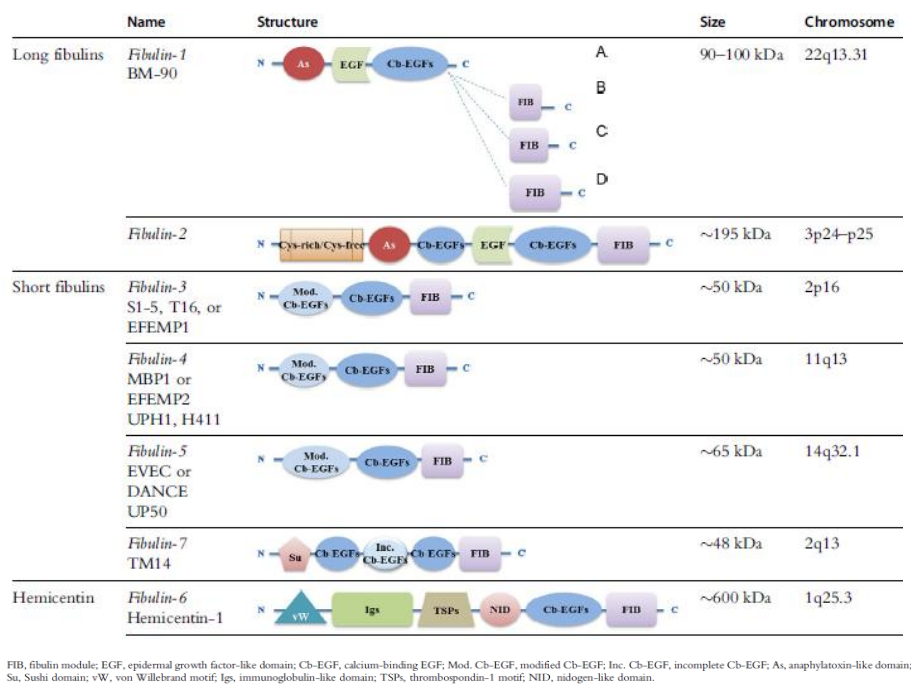


Fig 4. Estructura de les fibulines. Adaptada de Claudia Cangemi et.al. Advances in Clinical Chemistry 2014;67;245-265

6.2. Expressió de les fibulines

En el primer subgrup, trobem la fibulina-1 que es troba localitzada en humans en el cromosoma 22 (22q13.3)^[111] i té un pes molecular (PM) de 90-100 KDa. La fibulina-1 s'expressa en vasos grans, artèries coronàries, cervell i en teixits connectius^[41, 43, 112, 113] d'altres òrgans com són els ronyons, pulmons i fetge^[112]. Els ratolins deficientes en fibulina-1 presenten malformacions en ronyons i alvèols pulmonars, on els compartiments endotelials mostren cèl·lules irregulars^[114, 115], suggerint que la fibulina-1 deu interaccionar amb les cèl·lules endotelials.

La fibulina-2 és la segona proteïna més gran de la família de les fibulines amb un PM de 195 KDa i es troba en humans en la regió p24-p25 del cromosoma 3^[116]. Aquesta proteïna s'expressa durant el procés d'organogènesi embrionari^[117], en les cèl·lules precursors del múscul llis que formen els vasos dels arcs aòrtics^[118] i en el desenvolupament de cartílags^[42, 112]. A més s'ha descrit que la fibulina-2 juga un paper clau en la elastogènesi per la seva interacció amb el col·lagen tipus IV^[119]. La fibulina-2 es troba molt sovint colocalitzada amb la fibulina-1 i també intervenen en la remodelació de la matriu i mobilitat cel·lular^[29]. L'interacció de la fibulina-2 amb els proteoglicans versicà i agreca^[120, 121] formant una xarxa en el desenvolupament dels cartílags suggereix que aquestes unions juguen un paper important en l'estabilització i funció en la matriu del cartílag.

En el segon subgrup, les fibulines-3, -4, -5, -6 i -7 tenen respectivament PMs de 55, 61, 66, 615 i 50 KDa, sent la fibulina-6 el membre més gran de tota la família de fibulines.

La fibulina-3 situada en el cromosoma 2 (2p16)^[110] es troba expressada en la formació de l'àrea cranial, a la caixa toràcica i a les vertebres^[122]. Aquesta expressió suggereix que la fibulina-3 és important en el desenvolupament de l'esquelet. D'altra banda, diversos estudis *in vivo* demostren que animals deficients en fibulina-3^[123] o mutacions^[124] en aquest gen provoquen retinopaties diverses.

Els gens que codifiquen les fibulines-4 i -5 estan localitzats en els cromosomes 11 (11q13)^[29] i 14 (14q32.1)^[125] respectivament. Aquestes fibulines estan molt expressades en cor, i són presents en placenta, cervell, ronyons, pulmons, colon, ovaris i pàncrees^[18, 31, 126-128]. La fibulina-4 també s'expressa en fibroblasts humans, en les parets dels vasos i membranes basals, mentre que la fibulina-5 la trobem en regions on hi ha interaccions epitel·li-teixit connectiu, durant el desenvolupament de les artèries^[18, 126, 128]. També s'ha observat en una gran varietat de càncers (pit, ronyó, ovari i colon) que l'expressió de fibulina-5 es troba disminuïda, aquest fet ha suggerit que la fibulina-5 podria actuar com a supressor cancerigen^[102, 129].

La fibulina-6 situada al cromosoma 1 (1q25.3) s'expressa en fibroblasts de la pell i cèl·lules epitel·lials de la retina^[130, 131] i no han estat descrites

altres interaccions, mentre que la fibulina-7 situada al cromosoma 2 (2q13), és el membre més recent de la família i el menys estudiat. Es troba altament expressat en les dents, la placenta, els fol·licles capil·lars i els cartílags^[30].

6.3. Funcions de les fibulines

Les fibulines es troben expressades en una gran varietat de teixits i associades a moltes estructures de matriu mitjançant la seva interacció amb diversos constituents de la MEC. Aquestes interaccions actuen de ponts intermoleculars amb la MEC per formar macroestructures i també com a mediadors de processos cel·lulars i remodelació de teixits. Aquestes funcions de les fibulines s'han descrit en estudis genètics, en models animals i *in vitro*^[18, 45, 128].

La fibulina-1 ha estat associada a malalties cardiovasculars en diversos estudis. S'ha descrit que comparat amb controls, pacients amb diabetis tipus II presenten altes concentracions de fibulina-1 en plasma i un increment de la quantitat de fibulina-1 dipositada a la paret arterial, concretament al voltant de la làmina elàstica externa. A més a més s'han observat increments de fibulina-1 en teixits no arterioscleròtics de pacients diabètics. Aquests resultats postulen la fibulina-1 com un marcador de alteracions en la MEC arterial en pacients amb diabetis tipus II^[132].

La fibulina-1 s'uneix a diversos components de les membranes basals com són el domini globular C-terminal de les cadenes $\alpha 1$ i $\alpha 2$ de la laminina^[133, 134] i també als dominis globulars G2 i G3 del nidogen-1^[119, 135]. Aquestes interaccions permeten una estructura en forma de bastida que dona suport als teixits, com per exemple, en la funció e integritat dels capil·lars. La fibulina-1 actua d'unió amb el teixit connectiu i és essencial per la funcionalitat de la pell, pulmons, artèries i d'altres òrgans^[43].

Diversos estudis han descrit unions de les fibulines-1, -3, -4 i -5 amb la tropoelastina^[42, 43], jugant un paper important en la formació de les fibres elàstiques durant el seu desenvolupament. Més concretament, en aquest procés, s'ha descrit la unió de la fibulina-1 amb tropoelastina-2 i als proteoglicans agreca i versica a través del seu domini lectina tipus 2 C-terminal^[120, 121] i de la fibulina-5 amb elastina^[123, 136] i lisil oxidasa-1^[137, 138].

Aquest paper de les fibulines-1, -4 i -5 en la formació de fibres elàstiques també ha estat descrit en models animals. Els ratolins deficientes en fibulina-1 i -4 no són viables. Els primers, moren entre les 24 i 48h després de néixer presentant hemorràgies cranials i a nivell cutani^[104]. També s'ha observat irregularitats en la formació dels glomèruls renals i els alvèols pulmonars, i anomalies en els arcs arterials, glàndules de la faringe, nervis cranials i en l'esquelet cefàlic^[114, 115]. D'altra banda els deficientes en fibulina-4 moren al néixer, ja que presenten defectes vasculars molt importants com són irregularitats en les artèries,

aneurismes i hemorràgies^[98]. Aquests animals no formen fibres elàstiques fet que ens indica que la fibulina-4 juga un paper important en l'estabilitat vascular.

D'altra banda, els ratolins deficientes en fibulina-5 malgrat desenvolupar elastinopaties caracteritzades per una desorganització en les fibres elàstiques, són viables. Aquesta desorganització provoca una elongació en excés en la pell, extensió dels vasos sanguinis i pulmons^[44, 99], símptomes que presenten els pacients amb *Cutis Laxa*.

A banda de la seva funció en la formació i estructuració de la MEC, s'ha descrit el paper de les fibulines en una gran varietat de tumors. La fibulina-1D conté íntegrament el domini tipus fibulina i actua com a supressor de tumors^[139], inhibint processos cel·lulars com el creixement, adhesió i proliferació^[140], en canvi la fibulina-1C, la qual ha perdut 21 aminoàcids d'aquest domini es comporta com una proteïna oncogènica, on la seva expressió correlaciona amb l'agressivitat de tumors en ovaris^[141-145]. Les funcions de cada isoforma depenen de les diferents interaccions que aquestes tenen amb diferents proteïnes de la MEC^[45]. Així doncs el paper antitumoral de la fibulina-1D sembla ser degut a un bloqueig de l'adhesió de les cèl·lules tumorals per la fibronectina, la qual és un modulador de la mobilitat^[140]. D'altra banda, la isoforma C interactua amb el factor de creixement d'unió a heparina, el qual es troba implicat en la formació de tumors, migració i adhesió cel·lular^[146]. Per tant variants de la fibulina-1 actuen com a moduladors de la formació de

tumors. També s'ha descrit el paper de la fibulina-3 com un agent antitumoral bloquejant la migració de les cèl·lules endotelials en fibrosarcoma^[147]. Estudis recents mostren una disminució en l'expressió de fibulina-3 en carcinomes de faringe i la pèrdua de funcionalitat d'aquesta fibulina-3 correlaciona amb la progressió i metàstasi dels carcinomes^[148]. Un gran nombre d'estudis relacionen el paper de la fibulina-5 amb el procés tumoral^[129, 149-151]. S'ha demostrat una associació de la fibulina-5 amb l'expressió de MMPs en tumors, on una menor regulació estimula l'invasió cel·lular mediada per MMP-7 en cèl·lules de càncer de pulmó, mentre una sobre expressió de la fibulina-5 inhibeix la metàstasi del càncer de pulmó^[152]. Aquestes activitats antitumorals i pro tumorals succeeixen per diferent mecanismes. L'activitat antitumoral implica un augment de la regulació dels nivells de trombospondina-1^[153, 154], mentre l'activitat pro tumoral està mediada pel TGF- β ^[155].

Aquesta participació en els processos de creixement, proliferació i migració no es exclusiu del procés de la tumorigènesi, el nostre grup ha observat també que la fibulina-5 i la fibulina-4 es troben sobre expressades per la FABP-4^[156], una adipoquina associada a risc cardiovascular, disfunció endotelial i efectes pro inflamatoris sobre la migració i proliferació de cèl·lules musculars llises d'artèria coronària humana (HCASMC).

6.4. SNPs de les fibulines associats a malalties

Diverses mutacions en els membres de la família de les fibulines han estat associades a malalties^[128].

La fibulina-3 presenta la mutació (R345W) en el domini EGF, la qual és la causant d'una distròfia en la retina que es coneix amb el nom de *Malattia Leventinese*^[124], aquesta presenta la formació d'un *drusen* i neovascularització en la zona posterior de la retina, amb la conseqüent pèrdua de visió amb el temps.

En la fibulina-4, la mutació G169A està involucrada en la malaltia *Cutis Laxa*^[157], aquesta presenta anomalies en pell, òrgans i artèries provocant un excés de flexibilitat produït per un augment de fibres elàstiques. Recentment s'ha descrit la mutació Asp 203 Ala en l'exó 7, en nadons d'una regió de la Índia, anomenada *Malabar Mappila*^[158]. Aquesta mutació ha resultat ser letal en pacients homozigots i la mitjana de vida dels nadons ha estat de 4 mesos. Aquest desordre genètic es caracteritza per una deformació severa de les artèries elàstiques.

Les mutacions en la fibulina-5 estan relacionades amb les malalties *Cutis Laxa* i Degeneració macular associada a l'edat. En el cas de la primera s'han descrit les S227P i C217R que provoquen un plegament inadequat de la proteïna fent disminuir la seva secreció i també disminuint les interaccions d'aquesta amb elastina i fibrilina-1^[159, 160]. D'altra banda s'han descrit les mutacions G412E, G267S, I169T i Q124P que produeixen

una disminució en la secreció de fibulina-5 i estan implicades en la malaltia macular^[161].

7. FUNCIONS DE LA FIBULINA-2.

La fibulina-2 es troba localitzada de forma similar a la fibulina-1, així doncs la trobem en les membranes basals, les fibres elàstiques i altres estructures del teixit connectiu^[41, 43, 112, 113]. En les membranes basals també interacciona amb els dominis globulars G2 i G3 del nidogen-1 i la laminina igual que la fibulina-1, però la fibulina-2 també presenta interaccions amb el perlecà^[30]. En les fibres elàstiques, la fibulina-2 s'uneix a tropoelastina-2 i a fibrilina-1^[43], aquesta unió i la seva localització en la interfase entre les microfibrilles i l'elastina com hem esmentat anteriorment, fa pensar que la fibulina-2 actua d'unió de l'elastina amb aquestes microfibrilles^[43]. Aquestes interaccions i la disposició en forma de bastida confereixen a la fibulina-2 una funció molt important en l'estructuració, l'estabilització i l'elasticitat de la paret vascular^[162].

També s'ha demostrat que igual que la fibulina-1, la fibulina-2 s'uneix amb agreccà i versicà a través del domini lectina tipus-2 C-terminal^[120, 121] i forma una xarxa complexa que li confereixen al cartílag la seva força mecànica, jugant d'aquesta manera un paper important en l'estabilització i funcionalitat de la matriu del cartílag.

Com hem comentat, es detecta una elevada expressió de fibulina-2 en el desenvolupament embrionari^[117]. Posteriorment en el període post natal aquesta expressió es troba disminuïda en molts teixits, però segueix sent important en l'adventícia perivascular arterial i la membrana basal endotelial de mitjanes i grans artèries i també en vàlvules cardíques^[42, 112, 118]. L'expressió de fibulina-2 en teixits adults està induïda en condicions patològiques com serien la reparació de ferides a la pell i en lesions vasculars.

S'ha descrit que la fibulina-2 es present en les lesions vasculars i interacciona amb versicà i hialurònic en les plaques arterioscleròtiques. A banda, s'ha mostrat que aquesta interacció entre la fibulina-2 i el versicà és important per la migració de les CML^[29]. Les CML produeixen la fibulina-2 en resposta a la lesió vascular ja que la xarxa formada per la fibulina-2 i el versicà és important per a que les CML facin la seva funció durant la reparació de la paret del vas^[163].

Altres estudis indiquen que la fibulina-2 és essencial per l'activació del TGF- β induït per angiotensina II^[164]. L'angiotensina II és una neurohormona potent responsable de la hipertròfia cardíaca, en què el TGF- β serveix com un mediador principal. S'ha descrit que l'absència de fibulina-2 en ratolins atenua la senyalització de TGF- β , i els ratolins es troben protegits contra la disfunció ventricular progressiva i redueixen significativament la mortalitat després d'un infart agut de miocardi experimental^[165].

Pel que fa als models animals deficientes en fibulina-2 són animals viables, fèrtils i que no presenten anomalies anatòmiques. En aquests animals els nivells de fibulina-1 són elevats si els comparem amb els ratolins normals, suggerint que l'absència de fibulina-2 es compensada funcionalment per la fibulina-1^[166]. També s'ha descrit que els ratolins deficientes en fibulina-2 tenen una major supervivència després de patir un infart agut de miocardi respecte a ratolins salvatges^[165].

A banda de la relació de la fibulina-2 amb malaltia cardiovascular també s'han descrit efectes d'aquesta proteïna en altres malalties com seria el càncer. La primera associació deriva d'un estudi on la fibulina-2 és un dels 64 gens que es troben sobre expressats en tumors sòlids de diferent origen^[167]. Posteriorment diversos estudis han descrit que la fibulina-2 actua com a supressor de tumors. Concretament un dels estudis dut a terme amb diverses línies tumorals ha demostrat una correlació entre la pèrdua de fibulina-2 i una progressió del tumor^[168]. També s'ha observat una disminució de fibulina-2 en mostres de sarcoma de *Kaposi*^[169]. Una dada interessant en estudis recents és que la funció antiangiogènica de la fibulina-2 actua de manera conjunta amb una disminució de la regulació de dos factors antiangiogènics com són el factor de creixement VEGF i la MMP-2^[170].

Membre de les fibulines	Interaccions amb altres proteïnes	Expressió de les fibulines	Malalties o desordres en humans
Fibulina-1	fibronectina, agregà, versicà, nidogen, fibulina-7, laminina $\alpha 1$ i laminina $\alpha 2$, fibrinogen, ADAMTS-1.	parets del vasos, membranes basals, fibres elàstiques, cartílags.	distròfia en la retina
Fibulina-2	laminina $\alpha 2$, fibrilina, agregà, versicà, fibronectina, nidogen, perlecà, tropoelastina.	membranes basals, cor, placenta, ovari, cartílag.	
Fibulina-3	tropoelastina.	cartílag, ossos, retina.	Malattia leventinese. Distròfia en la retina. Degeneració macular associada a l'edat.
Fibulina-4	tropoelastina.	cor, pulmons, ronyons, cartílag.	Aneurisma aòrtica. <i>Cutis laxa</i> (moderada)
Fibulina-5	tropoelastina, elastina, LOXL-1, LTBP-2.	vasos grans, pulmons, úter, cartílag.	<i>Cutis laxa</i> . Degeneració macular associada a l'edat.
Fibulina-6	No s'han descrit	fibroblast de la pell, epitelí de la retina	Degeneració macular associada a l'edat.
Fibulina-7	fibronectina, heparina, fibulina-1.	incisius, molars, cartílags, fol·licles del cabell	

Taula 1. Taula resum de les interaccions de cada membre de la família de les fibulines amb altres proteïnes, llocs on s'expressen i malalties o desordres humans en les quals es troben involucrades. . Adaptada S. de Vega et.al. Cell.Mol.Life Sci:2009;66;1890-1902

8. ESTATINES I PARET VASCULAR

Les estatines, inhibidores de l'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (HMG-CoA) reductasa, són una família de varies molècules que pertanyen al mateix grup terapèutic. Aquestes molècules actuen reduint la producció endògena de colesterol amb la consegüent disminució del seu contingut intracel·lular.

El colesterol és un component essencial de les membranes cel·lulars i és el precursor immediat de les hormones esteroides i dels àcids biliars, però si es troba present en quantitats excessives, passa a ser un factor de risc de malaltia cardiovascular ^[171, 172]. Tot i que la concentració sèrica de colesterol pot estar influïda per la dieta, el 60% d'aquest es sintetitza al fetge a partir d'una sèrie de reaccions on l'enzim HMG-CoA reductasa n'és el limitant. Aquest enzim és l'encarregat de regular la conversió de HMG-CoA a mevalonat, component essencial en la síntesi intracel·lular del colesterol. Per tant la inhibició d'aquest enzim per les estatines és un tractament clau per reduir la concentració sèrica de colesterol. Les estatines, al reduir la síntesi de cLDL, promouen una regulació positiva dels receptors de les LDL als hepatòcits. Aquesta regulació porta a una disminució entre un 30 i un 54% del cLDL, un augment entre un 5 i un 10% del colesterol de les lipoproteïnes d'alta densitat (cHDL) i una reducció d'un 10% dels triglicèrids. Amb aquests efectes hipolipemiants i la relació lineal entre la disminució de colesterol i la incidència de malaltia

cardiovascular, aquests medicaments són els més emprats en la prevenció primària i secundària d'aquestes malalties^[173-179].

A banda de l'acció sobre els lípids plasmàtics, l'ús d'estatines també produeix diversos efectes beneficiosos anomenats efectes pleiotròpics. Entre aquests efectes podem destacar la millora de la funció endotelial, efectes antioxidants, la disminució de la proliferació de CML, un efecte antiinflamatori, i l'estabilització de la placa arterioscleròtica. S'ha demostrat en diversos estudis que aquests efectes alteren la biologia de la placa i alenteixen la progressió de l'arteriosclerosi^[180].

La disfunció endotelial es troba caracteritzada per una disminució en la disponibilitat de NO. El NO es difon des de les cèl·lules endotelials a les CML estabilitzant la forma inactiva de la miosina i en conseqüència la vasodilatació. Diversos estudis han demostrat que les estatines produeixen un augment de eNOS, enzim que catalitza la formació de NO, produint un augment del flux sanguini i vasodilatació^[181].

També s'ha observat que les estatines disminueixen els mecanismes inflamatoris a través de la disminució de l'activació de NFκ-B^[182] i de la modulació de citocines. Menors nivells de NFκ-B disminueixen el reclutament de les cèl·lules inflamatòries i una menor expressió de citocines provoca menor proliferació de CML.

Un altre efecte beneficiós és l'augment de l'expressió de col·lagen intersticial, aquest col·lagen es va dipositant a la placa, augmentant el gruix de la capa fibrosa i com a conseqüència s'estabilitza la placa^[183].

A l'inhibir la HMG-CoA reductasa, les estatines interfereixen en la formació d'isoprenoides (Figura 3). Els isoprenoides són molècules, com el farnesilpirofosfat (FPP) o el geranilgeranilpirofosfat (GGPP)^[184], derivats del metabolisme del mevalonat, que actuen com a dianes lipídiques i afavoreixen modificacions postraduccionals d'una gran varietat de proteïnes reguladores, claus en els processos de senyalització intracel·lular. De fet la unió d'un isoprenoide al residu de cisteïna de l'extrem C terminal d'aquestes proteïnes (prenilació) és necessària per unir-se a la membrana cel·lular i activar el mecanisme d'acció relacionat amb la migració, la diferenciació i la proliferació cel·lular. Entre aquestes proteïnes trobem les proteïnes G, la laminina nuclear i les proteïnes d'unió a GTP com són Ras, Rho, Rab, Ral, Rap i CDC42^[185]. Els majors substrats de la prenilació són Ras i Rho, aquestes s'uneixen a GTP i provoquen el pas de la forma inactiva a la forma activa. En les cèl·lules endotelials la translocació de Ras del citoplasma a la membrana plasmàtica depèn de la farnesilació (unió del farnesil) mentre que la de Rho depèn de la geranilació (unió d'una fracció de geranilgeranil)^[186].

La família Rho està formada per RhoA, Rac i Cdc42 i les seves funcions principals són regular la reorganització de l'esquelet i l'expressió gènica^[187-189]. RhoA és el membre més conegut de la família de proteïnes

Rho i juntament a l'efecte de l'organització de l'actina en el citoesquelet o a través d'aquest, regula un ampli ventall de funcions cel·lulars fonamentals com ara la contracció del múscle llis, la mobilitat, la proliferació i l'apoptosi. Totes aquestes funcions estan regulades per RhoA a través de l'activació de la proteïna senyalitzadora Rho-quinasa (ROCK).

Un equilibri perfecte entre contracció i relaxació del múscle llis és crític en el manteniment d'algunes funcions biològiques i trastorns en aquest procés dinàmic són causa de diverses patologies^[190]. El to muscular del múscle llis juga un paper fonamental en la regulació de la pressió, del flux, la permeabilitat capil·lar i d'altres funcions cardiovasculars.

S'ha descrit que la activació de la via RhoA/ROCK, té efectes significatius sobre diverses malalties cardiovasculars com hipertensió (HTA), arteriosclerosi, angina de pit o hipertròfia del miocardi^[191].

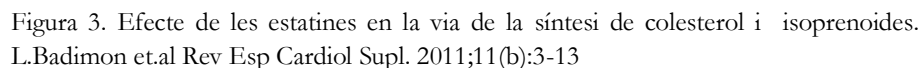
La HTA és un dels desordres cardiovasculars més comuns que es caracteritza per un to vascular alterat i un increment de la contractilitat vascular. L'augment de la pressió provoca la proliferació i la migració de les CML vasculars i un augment de la inflamació de la paret arterial, processos que provoquen el remodelatge vascular.

Diversos estudis han demostrat que la regulació de la via ROCK juga un paper crucial en el remodelatge vascular. Així s'ha descrit que la inhibició

de ROCK causa l'activació de eNOS i la reducció de la inflamació vascular, millorant el procés arterioscleròtic.

També s'ha observat que l'angiotensina II activa la via ROCK i regula el citoesquelet, relacionant directament l'activació de ROCK amb el remodelatge vascular patològic^[192-194]. Per tant a través d'aquests efectes sobre les proteïnes cel·lulars, les estatines tenen una sèrie de propietats antiateroscleròtiques i antitrombòtiques importants.

Altres mecanismes independents de la unió a RhoA estimulen de manera efectiva l'activitat ROCK. Un dels més estudiats és l'efecte de l'àcid araquidònic^[195, 196]. Els lípids sembla que s'uneixen al regulador C-terminal de ROCK, trencant l'auto inhibició de l'interacció i així permetent l'activació de la quinasa.



La HTA és una malaltia crònica que es caracteritza per un augment continu o sostingut de la tensió arterial en les artèries. La tensió arterial, és la força que exerceix la sang contra les parets dels vasos (artèries) al ser bombejada pel cor. Durant la sístole s'expulsa cap a les artèries una gran quantitat de sang provocant que aquestes es dilatïn al màxim, acumulant una gran quantitat d'energia elàstica per poder distribuir aquesta sang cap a la resta del cos. En aquest punt la tensió arterial és màxima i s'anomena pressió arterial sistòlica (PAS). Durant la diàstole les

artèries utilitzen l'energia acumulada per impulsar el flux sanguini i distribuir la sang als diferents òrgans. En aquest punt la tensió arterial és mínima i s'anomena pressió arterial diastòlica (PAD).

Quan més alta és la tensió, major esforç ha de realitzar el cor per bombejar la sang i si aquesta puja per sobre del límit normal es produeix HTA. Segons barem internacional, es considera HTA una pressió sistòlica per damunt de 139 mmHg o una pressió diastòlica major de 89 mmHg.

Incrementos de la PAS i la PAD contribueixen a unes taxes de morbiditat i mortalitat considerablement elevades ja que es tracta d'una malaltia comú en tot el món i afecta al 20 % dels adults entre 40 i 65 anys i quasi al 50% de les persones de més de 65 anys. Per aquest motiu es considera un dels problemes més importants de salut pública, especialment en els països desenvolupats.

La HTA crònica és el factor de risc modificable més important per desenvolupar malalties cardiovasculars, així com problemes vasculars a nivell de cervell i de ronyons. I a la vegada hi ha molts i diversos factors de risc per la HTA com són l'edat, el sexe, antecedents familiars, tabaquisme, dieta, medicaments, obesitat i diabetis^[197-200]. En molts casos modificar l'estil de vida és suficient per controlar la HTA. Per tant fer activitat física moderada, deixar de fumar, un consum moderat d'alcohol

i una dieta saludable, ajuden a regular la tensió arterial i prevenir les malalties cardiovasculars.

D'altra banda, quan la dieta no és suficient, hi ha diferents tractaments farmacològics per disminuir la tensió arterial i d'aquesta manera reduir el risc de patir un episodi cardiovascular. L'elecció del fàrmac depèn de quina és la causa de la HTA. Alguns d'aquests tractaments regulen vies involucrades en l'estructura i funció de la paret arterial, l'alteració d'aquestes vies provoquen la rigidesa arterial que en molts casos és l'origen de la HTA. Aquest factor estructural de la hipertensió es pot produir tan en grans com en mitjanes artèries.

Diversos estudis han descrit una disminució de l'elasticitat de les artèries amb l'edat. Aquest fet es deu a un deteriorament i ruptura de fibres de col·lagen i d'elastina. Aquest fet provoca que les artèries tinguin menor capacitat per dilatar-se i augmenti la pressió sistòlica^[74].

D'altra banda s'ha demostrat que un augment del gruix de la paret vascular provoca una disminució de la llum vascular, aquest fet provoca que el flux sanguini es redueixi i augmenti la pressió diastòlica.

El coneixement d'aquestes vies involucrades en l'estructura i la funció cardiovascular i l'estudi de possibles gens vinculats, han permès identificar gens associats a rigidesa arterial i HTA.

10. PAPER DE LES FIBULINES EN EL REMODELATGE VASCULAR I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR.

La remodelació vascular, com hem comentat anteriorment, és un procés que no tan sols implica canvis en la matriu i en cèl·lules intersticials, sinó també genera canvis en les respostes de les cèl·lules cardiovasculars, endotelials i musculars llises^[59].

En tot el procés de remodelatge la MEC té una gran importància en els vasos sanguinis, tan en condicions fisiològiques com patològiques, ja que juga un paper molt important en les característiques mecàniques, però també en els processos de migració, i proliferació de les CML i cèl·lules endotelials^[53, 57].

Les fibulines, components importants en la MEC, juguen un paper molt actiu en aquests processos. Concretament les fibulines implicades en aquests processos i que estan relacionades amb malalties cardiovasculars són les fibulines-1, -2, -4 i -5^[29].

La fibulina-1 està associada en processos de calcificació en ratolins. Clàssicament s'han distingit dos tipus de calcificació arterial depenent del lloc on es deposita el calci. Així doncs podem trobar calcificació arterial de l'íntima (associada a la placa d'ateroma)^[201] i calcificació de la media

(coneguda com esclerosi de *Mönckeberg*)), lligada a la rigidesa vascular per mineralització de les fibres elàstiques i l'arteriosclerosi observada amb l'edat, diabetis i la malaltia renal crònica^[202]. La primera està relacionada amb un augment de la deposició de lípids i la infiltració de cèl·lules inflamatòries mentre que en la segona tindria més influència el canvi de fenotip de les CML cap a cèl·lules semblants a osteoblasts.

Un estudi de *microarray* demostra que l'expressió de fibulina-1 és troba incrementada fins a quatre cops més en CML de ratolins amb mineralització^[203]. A més, la fibulina-1 és un component que trobem colocalitzat amb fibrinogen en lesions arterioscleròtiques en humans^[204]. També es relaciona l'expressió de fibulina-1 amb rigidesa arterial, s'ha observat en un estudi genòmic que l'expressió gènica de fibulina-1 és major en l'aorta humana de pacients amb un increment de rigidesa arterial^[205]. Aquestes indicacions suggereixen que l'expressió de fibulina-1 és essencial per un bon funcionament de la vasculatura i té un paper actiu en l'homeòstasi del vasos.

La fibulina-2 es present en lesions vasculars (lesions arterioscleròtiques) de ratolins. En concret l'augment d'expressió de fibulina-2 permet millorar la migració de les CML durant la reparació del mecanisme^[163]. D'altra banda, la fibulina-2 és absent en les regions amb macròfags, per tant sembla que no està associada a processos inflamatoris.

També està demostrat, que les fibulines-1 i -2 es troben reduïdes en pacients amb dissecció aòrtica^[206, 207], dolència greu on la MEC presenta una degradació accelerada, apoptosi i elastogènesi, que augmenta la necrosi de les CML i la fibrosi de les fibres elàstiques. La dissecció aòrtica pot tenir un component genètic però també està adquirida per condicions com són l'arteriosclerosi i la hipertensió crònica.

En el cas de la fibulina-4 està descrit que una reducció de la seva expressió en ratolins, augmenta la formació d'aneurismes i la dissecció aòrtica per disrupció de la làmina elàstica^[208].

El paper de la fibulina-5 com a inhibidor de la proliferació i migració de les CML i la desaparició de la proteïna causa un remodelatge vascular anormal. A més la fibulina-5 contribueix a l'estabilitat mecànica dels vasos a través de les seves interaccions amb elastina. La fibulina-5 es troba reduïda en la paret aòrtica de pacients amb dissecció aòrtica toràctica, la qual es caracteritza per la fragmentació de l'elastina en la paret arterial, probablement causada per la disminució de fibulina-5^[209].

11. IMPACTE DE LA HTA I ALTRES FACTORS DE RISC EN EL REMODELATGE VASCULAR I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR

La HTA és una malaltia que afecta a la paret vascular a nivell d'endoteli, múscul llis i fibroblast, i es produeix per la interacció d'estímuls hemodinàmics, de substàncies vasoactives i factors de creixement locals.

Aquestes interaccions i el remodelatge que es produeix a nivell vascular implica una sèrie de canvis en diversos processos com la proliferació, migració^[191] i mort cel·lular i la síntesi i degradació de la MEC. La proliferació i migració de les CML des de la media cap a l'íntima i la inflamació de la paret, participen en una varietat de trastorns vasculars i contribueixen a la progressió de malalties com l'arteriosclerosi.

Altres factors de risc com són la diabetis i les dislipèmies, malalties on trobem alterades les quantitats de glucosa i greixos respectivament, també contribueixen a un remodelatge vascular. En el cas de la diabetis un augment de la glucosa en sang afavoreix la deposició de lípids disminuint l'elasticitat de les artèries, promou la proliferació de les CML provocant una hipertròfia de la media i augmenta l'expressió de l'endotelina que afavoreix la vasoconstricció, tots aquests mecanismes afavoreixen la HTA. D'altra banda un augment de la quantitat de greixos en circulació origina una disfunció endotelial i com a conseqüència les lipoproteïnes oxidades queden retingudes durant més temps. Aquestes

lipoproteïnes oxidades augmenten la producció de superòxid, la peroxidació lipídica i poden modular l'expressió de gens que augmentaran la proliferació i migració de les CML. Tots aquests canvis impliquen un remodelatge vascular que pot derivar en arteriosclerosi.

També existeixen factors de risc com són el tabaquisme o el sedentarisme que estan originats per conductes alimentàries i socials no adequades i també afecten la remodelació de la paret augmentant la rigidesa arterial. Està descrit un augment de MMP-9 i de TIMP-1 en fumadors, relacionat amb la duració de l'exposició al tabac^[210]. I també s'ha relacionat la concentració de TIMP-1, però no la de MMP-9 amb l'índex de massa corporal^[211].

En la majoria dels processos en el remodelatge vascular on la HTA i altres factors de risc estan implicats hi juguen un paper important les fibulines, tot i que els mecanismes implicats encara no s'han descrit.

12. IMPACTE DE LES ESTATINES I ALTRES FÀRMACS CARDIOVASCULARS EN EL REMODELATGE VASCULAR I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR

Com hem comentat anteriorment, les estatines són uns fàrmacs emprats en pacients amb diverses malalties cardiovasculars pels seus beneficis més enllà dels efectes hipolipemians.

Entre aquests efectes pleiotròpics podem destacar els efectes antihipertensius i els antiaterotrombòtics^[212-214].

Entre els mecanismes antiaterotrombòtics de les estatines trobem els que afecten les plaques arterioscleròtiques com són menor proliferació de CML, millora endotelial, resistència a l'oxidació de les LDL o menor cúmul de colesterol en macròfags i els que afecten la formació de trombus com la viscositat sanguínia, la fibrinòlisis o l'agregació plaquetària^[215].

D'altra banda les estatines tenen un impacte important a diferent nivell en mecanismes antihipertensius. En el sistema renina angiotensina produeixen descensos de l'activitat de l'enzim convertidor de l'angiotensina (ECA), de l'expressió de receptors AT1 i també de l'aldosterona. A nivell de remodelatge vascular i de reactivitat vascular

produeixen un descens d'isoprenoides amb la posterior modulació de la mitosi i la modulació dels nivells de calci a les CML. I també es coneixen els beneficis endotelials on les estatines augmenten la quantitat de NO, produeixen un descens dels radicals lliures i promouen un descens del tromboxans i endotelina^[216].

Altres fàrmacs implicats en diverses malalties cardiovasculars són els fàrmacs antihipertensius, els quals es prescriuen sols o combinats segons els antecedents i necessitats de cada pacient.

Entre els hipotensors més emprats trobem els diürètics, inhibidors adrenèrgics, vasodilatadors, BCC (bloquejant dels canals de calci), IECA (inhibidors de l'ECA) i els ARA II (antagonistes dels receptors d'angiotensina II).

D'entre aquests grups en podem destacar diversos que afecten la rigidesa vascular per diferents mecanismes. Els IECA que bloquegen l'enzim convertidor d'angiotensina, inhibeixen la formació d'angiotensina II i redueixen la degradació de bradiquinina i d'altres quinines, i els ARA II que bloquegen els receptors tipus I de l'angiotensina II. Mitjançant aquests mecanismes aquest fàrmacs redueixen la resistència perifèrica i són adequats per pacients que presenten insuficiència cardíaca, disfunció sistòlica, malaltia coronària i proteïnúria. Un altre grup són els BCC, que bloquegen els canals de calci i a banda de reduir la resistència perifèrica

també tenen efectes diürètics. Aquest grup és adequat per pacients amb HTA sistòlica i malaltia vascular perifèrica.

II.HIPÒTESI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

HIPÒTESI

Durant l'evolució i progressió de l'arteriosclerosi es produeix un procés de remodelatge vascular que afecta els components i l'estructura de la paret arterial. Aquest remodelatge vascular inclou, entre d'altres, la proliferació de les cèl·lules musculars llises i la producció i degradació de la matriu extracel·lular i dels seus components. Uns d'aquests components són les fibulines, proteïnes secretades per les cèl·lules musculars, que participen en l'estructuració de la matriu extracel·lular mitjançant diferents interaccions moleculars i funcionen també com a proteïnes reguladores.

D'altra banda, la hipertensió arterial és una malaltia complexa i multifactorial on el remodelatge vascular hi juga un paper molt important i amb un patró hereditari poligènic que explicaria entre un 30% i un 40% de la seva variabilitat. De manera que l'estudi de nous gens candidats associats a hipertensió permetria avançar en el coneixement d'aquesta malaltia. A més, un factor ambiental clau en el control de la hipertensió és el component dietètic.

Finalment, el tractament farmacològic contra la hipertensió i la hipercolesterolèmia estan associats a una reducció del risc cardiovascular, de manera que són àmpliament utilitzats com a teràpia preventiva.

Segons això, la nostra hipòtesi es que polimorfismes en els gens que codifiquen les fibulines estan associats a la pressió arterial, i l'expressió *in vitro* de les fibulines pot ser alterada pels fàrmacs utilitzats com a teràpia preventiva cardiovascular (estatines i fàrmacs hipotensors) i per factors ambientals com els àcids grassos.

III.OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

OBJECTIUS

1- Estudi d'associació de gens candidats.

Estudiar variacions genètiques en forma de “single nucleotide polymorphisms” (SNPs) en els gens de les fibulines-1, -2 i -5 associats a la hipertensió essencial.

2- Determinar l'efecte in vitro de fàrmacs utilitzats com a teràpia preventiva cardiovascular sobre l'expressió gènica i proteica de les fibulines-1, -2, -4 i -5 en cèl·lules musculars llises:

2.1. Efecte de la simvastatina com a fàrmac hipocolesterolèmic.

2.2. Efecte del lisinopril i amlodipina com a fàrmacs antihipertensius.

3- Caracteritzar els mecanismes implicats en els efectes positius observats en l'objectiu 2.

4- Determinar els efectes de diferents tipus d'àcids grassos sobre l'expressió gènica i proteica de les fibulines-1, -2, -4 i -5.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

IV.MATERIALS I MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

El desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'ha dut a terme a la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, unitat certificada amb la norma de qualitat ISO 9001 implantat en el Sistema de Gestió de la Qualitat de Recerca, Desenvolupament e Innovació de la Universitat Rovira i Virgili.

Els materials i mètodes emprats en els diversos estudis es troben explicats en detall en els articles que s'han originat dels resultats obtinguts. A continuació es descriu breument els mètodes dels resultats addicionals que estan pendents de publicació.

1. SELECCIÓ I GENOTIPATGE DELS *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS* (SNPs)

Es va testar la hipòtesi que les fibulines-1 i -5 estarien implicades en la regulació de la pressió arterial i per tant serien gens candidats de susceptibilitat per la HTA.

Es van seleccionar SNPs que tinguessin una alta freqüència de l'al·lel menor, que fossin *tag-SNPs* per diferents blocs de lligament, per tant que no estiguessin en desequilibri d'unió i a ser possible que ocasionessin una variant funcional. De manera que representessin globalment el percentatge més gran possible de la variació d'aquests dos gens. Així doncs, es van seleccionar 7 SNPs en els dos gens candidats, i es va dur a terme un estudi d'associació amb la HTA. Per seleccionar els diferents polimorfismes es va utilitzar la base de dades internacional *HapMap*

(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). En el gen de la FBLN1 es van seleccionar els SNPs rs7510719 (exò 4) i rs9682 (exò 9). I en el gen de la FBLN5 es van escollir els SNPs rs2474030 (promotor), rs2430347 (exò 9), rs2284340 i rs2430363 (intró 4) i rs2267989 (intró 10).

El DNA genòmic es va extreure dels leucòcits perifèrics aïllats de sang venosa anticoagulada emprant el Kit QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen Iberia SL, Madrid, Spain) i seguint les instruccions del proveïdor.

El genotipatge es va realitzar al Centro Nacional de Genotipado (CEGEN). Per dur a terme el genotipatge dels polimorfismes es va utilitzar la plataforma Sequenom's MassARRAY seguint el protocol de iPLEX Gold (Sequenom Inc., San Diego, CA). Es van fer duplicats de 5 mostres amb SEQUENOM[®] i van donar un 100% de consistència.

2. ESTUDI IN VITRO

(Efecte de fàrmacs antihipertensius sobre l'expressió de fibulines)

2.1. Tipus cel·lular i reactius

Es van utilitzar les HCASMC (*Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells*) comprades a Cascade BiologicsTM. Tot el material pel creixement i

manteniment de les cèl·lules també es va adquirir a Cascade BiologicsTM. Les cèl·lules es van cultivar en medi 231, que es va suplementar amb el sèrum i els antibiòtics gentamicina i amphotericina. El lisinopril i l'amlodipina es van comprar a Sigma-Aldrich. Les plaques de petri de 6 pous i les de 10 Ø es van comprar a Nunc.

2.2. Efecte del lisinopril i l'amlodipina sobre les fibulines

En aquests experiments es van estudiar els efectes de diferents fàrmacs emprats com a tractament antihipertensiu i que actuen directament en la paret vascular, sobre l'expressió de les fibulines.

Les HCASMC van créixer fins al 80% de confluència i un cop en aquest punt es van incubar amb concentracions creixents de lisinopril (0, 50 i 150µM) i d'amlodipina (0, 5 i 10µM) durant 24 hores. Passat aquest temps les cèl·lules de les plaques de 6 pous es van lisar per extreure el RNA total i les plaques de petri de 10 Ø es van processar per extreure la proteïna total. Tots els experiments que es presenten es van dur a terme en passatge 6.

2.3. Aïllament de RNA

Les cèl·lules es van lisar amb el tampó de lisi *Nucleic Acid Purification* (Applied biosystems) i posteriorment es va aïllar el RNA total amb

l'aparell ABI PRISM 6100 *Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems) seguint les instruccions de la casa comercial. La qualitat del RNA es va comprovar mitjançant la relació d'absorbància i la quantificació de la concentració es va dur a terme utilitzant el *kit Quant-iT RNA Assay* (Invitrogen) basat en fluorescència. Les lectures es van fer amb l'aparell *Qubit* (Invitrogen).

2.4. RT-PCR a temps real

La quantificació de l'expressió gènica de les fibulines induïda pels diferents fàrmacs es va analitzar per RT-PCRtr. Així, 0.5 µg de RNA total de cada mostra es van transcriure a cDNA utilitzant Random Hexamers i l'enzim *SuperScript II* (Invitrogen) seguint el protocol de la casa comercial.

L'expressió dels nostres gens es va avaluar amb l'aparell ABI PRISM 7900HT Detection System (Applied biosystems). Els *primers* i les sondes *Taqman* pels diferents gens d'estudi, fibulina-1, -2, -4 i -5, 18s i GAPDH es van obtenir a partir de productes *Gene Expression Assays* (Life Technologies) validats i pre-dissenyats.

L'expressió del mRNA de cada gen i per cada mostra es va calcular utilitzant el mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les cèl·lules no tractades (control) es van emprar com a calibrador de l'experiment i l'expressió dels gens GAPDH i 18s es van utilitzar com a control endogen.

2.5. Extracció de proteïna

L'extracció proteica es va dur a terme a 4°C i amb tot el material fred. Després de tres rentats amb PBS, el pellet cel·lular es va obtenir de les plaques de cultiu mitjançant rascatge amb un *cell-lifter* en PBS i posterior centrifugació a 1500 rpm durant 5 minuts a 4°C. Aquest pellet es va homogeneïtzar en tampó hipotònic (100µl) i després de la centrifugació a 16,000 x g durant 10 minuts i 4°C les proteïnes citoplasmàtiques contingudes en el sobrenedant i les proteïnes nuclears contingudes en el pellet es van emmagatzemar a -80°C. La quantificació de la concentració proteica es va fer per Bradford amb l'aparell *GeneQuant*.

2.6. Western blot de proteïnes citoplasmàtiques

Els nivells d'expressió proteica de les fibulines induïts pels diferents fàrmacs es van analitzar per *western blot*. L'electroforesi i la transferència de la membrana es van realitzar mitjançant *NUPAGE Protein Analysis System* (Invitrogen). Per dur a terme l'electroforesi es van utilitzar diferents gels i tampons comercials segons les característiques de cada proteïna i recomanacions del proveïdor.

Aquesta metodologia està àmpliament descrita a l'article "simvastatin increases fibulin-2 expression in HASMC via RhoA/Rho-kinase signaling pathway inhibition".

Les bandes de les membranes es van visualitzar a l'aparell Versadoc (Bio Rad) per fluorescència utilitzant reactius ECL (Invitrogen) i es van quantificar i normalitzar per l'expressió d'actina mitjançant el software Quantity One 1-D Analysis versió 4.6.2.

2.7. Citotoxicitat

Les condicions dels experiments (dosis i temps) es van preseleccionar a partir de la bibliografia.

La citotoxicitat de les concentracions seleccionades es van fer determinant la quantitat de LDH secretada al medi extracel·lular. Per fer aquesta mesura de LDH es van utilitzar dos mètodes. En primer lloc es va mesurar la quantitat de LDH en l'analitzador automàtic Cobas-Mira (Roche, Switzerland) que utilitza un mètode enzimàtic (Boehringer Mannheim, GmbH). D'altra banda es va analitzar el medi de cultiu mitjançant el *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Applied Science), que consisteix en un assaig colorimètric que quantifica la mort cel·lular per lisis.

Les cèl·lules també es van observar al microscopi de contrast de fase per detectar possibles canvis morfològics.

Cap de les condicions i temps testats van induir efectes citotòxics sobre les cèl·lules d'estudi.

V.RESULTATS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

1. ESTUDI 1 (TWO VARIANTS IN THE FIBULIN2 GENE ARE ASSOCIATED WITH LOWER SYSTOLIC BLOOD PRESSURE AND DECREASED RISK OF HYPERTENSION)

Two Variants in the Fibulin2 Gene Are Associated with Lower Systolic Blood Pressure and Decreased Risk of Hypertension

Joan-Carles Vallvé^{1*}, Noemí Serra¹, Guillermo Zalba², Ana Fortuño², Óscar Beloqui³, Raimon Ferre¹, Josep Ribalta¹, Lluís Masana¹

1 Facultat de Medicina (URLA), Universitat Rovira i Virgili, Hospital Sant Joan, IISPV, CIBERDEM, Reus, Catalonia, Spain, **2** Division of Cardiovascular Sciences, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spain, **3** Department of Internal Medicine, University Clinic, University of Navarra, Pamplona, Spain

Abstract

Arterial stiffness is an important factor in hypertension. Fibulin 2 is an extracellular matrix scaffold protein involved in arterial stiffness and, hence, the fibulin 2 (FBLN2) gene may be a candidate for hypertension susceptibility. 4 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of FBLN2 were evaluated in an association case-control study containing 447 hypertensive patients and 344 normotensive control subjects. The minor allele frequencies of rs3732666 and rs1061376 were significantly lower in hypertensives. The odds ratios (OR) for having the protective G (rs3732666) and T (rs1061376) alleles were 0.75 (95%CI: 0.58 to 0.96) and 0.83 (95%CI: 0.66 to 1.02), respectively. For rs3732666, the OR for hypertension in AG+GG subjects, compared with AA, was 0.71 (95%CI: 0.52 to 0.95). The protective genotype AG+GG was associated with significantly lower systolic blood pressure (SBP) [−3.6 mmHg (P=0.048)]. There was a significant age interaction with rs3732666; the effect decreasing with increasing age. For rs1061376, TT subjects had an OR for hypertension of 0.53 (95%CI: 0.32 to 0.87) compared with CC subjects, with reduced SBP (−7.91 mmHg; P=0.008) and diastolic BP (DBP) (−3.69 mmHg; P=0.015). The presence of a G allele was an independent predictor of intima-media thickness (IMT); G carrier's having lower mean IMT (−0.037 mm, P=0.027) compared with AA. Our results provide the first evidence for FBLN2 as a new gene associated with hypertension.

Citation: Vallvé J-C, Serra N, Zalba G, Fortuño A, Beloqui Ó, et al. (2012) Two Variants in the Fibulin2 Gene Are Associated with Lower Systolic Blood Pressure and Decreased Risk of Hypertension. PLoS ONE 7(8): e43051. doi:10.1371/journal.pone.0043051

Editor: Christina Lynn Addison, Ottawa Hospital Research Institute, Canada

Received: October 13, 2011; **Accepted:** July 16, 2012; **Published:** August 13, 2012

Copyright: © 2012 Vallvé et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study was funded by grants from The Instituto de Salud Carlos III (PI030786 and PI10/02547) (www.isciii.es) and from Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (Europa.eu). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jc.vallve@urv.cat

Introduction

Increases in systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively) contribute to millions of deaths worldwide every year due to coronary heart disease, stroke, and other vascular diseases [1,2]. Pharmacological treatment to lower blood pressure markedly reduces the risk of an adverse cardiovascular event, particularly stroke, in hypertensive individuals [3,4]. Genetic and environmental factors combine in determining the arterial tone and blood pressure [5,6]. Among the modifiable factors, the biggest contributors to hypertension are diet (mainly salt intake), obesity, and diabetes [6–9]. Knowledge of pathways involved in cardiovascular structure and function together with the candidate gene linkage approach, has identified many genes associated with increased arterial stiffness and high blood pressure [10]. Additionally, recent genome-wide association studies have identified different single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with SBP, DBP, and essential hypertension [11,12]. The direct clinical value of such genetic association studies continues to be debated [13] but, nevertheless, identifying contributory genes does advance the understanding of blood pressure regulation and enables vulnerable individuals to be identified so that a better strategy of prevention and treatment of hypertension may be implemented.

Arterial stiffness is defined as a reduction in arterial distensibility [14]. Mechanisms controlling arterial tone are multiple and include sympathetic system [15], systemic hormones [16], local vasodilators and vasoconstrictors produced by endothelial cells [17,18], smooth muscle cell tone [19,20] and extracellular matrix (ECM) structure [14,21].

Fibulin 2 is an ECM protein first identified in 1990 [22]. It belongs to a seven-member family of extracellular glycoproteins [23]. Fibulin 2 serves as a scaffold protein in the ECM by binding to a variety of ligands including type IV collagen, aggrecan, and versican [24,25]. Biochemical interaction assays show that fibulin 2 also binds numerous basement membrane proteins including nidogen, laminin, fibrillin, and fibronectin [24,26,27]. This multifunctional binding capacity suggests that fibulin 2 is involved in configuring, maintaining, and integrating ECM and basement membranes. Additionally, fibulin 2 has been shown to participate in the remodeling of ECM during embryonic development [28], wound healing [29], and cancer cell invasion [30].

It is its high binding affinity to elastin that allows fibulin 2 to participate in the mechanisms of elastic fiber assembly [31,32]. Indeed, fibulin 2 and fibulin 5 have been shown recently to cooperate in forming the internal elastic lamina of blood vessels [33] which is one of the structures involved in providing elasticity

and recoil to the vessel wall. Vessel structure can be regulated, additionally, by alterations in matrix crosslinking [34].

Structural alterations of the vessel wall which include fracturing of elastin [35], increased collagen content [36], and ECM remodeling [37] result in increased vascular stiffness which, in turn, is one of the mechanisms involved in systolic hypertension [38,39]. Vascular extracellular matrix components such as collagens, elastin, glycoproteins, proteoglycans and fibulins provide mechanical integrity to the vessel wall; the quantity and the quality of these components determining vascular stiffness in hypertension.

Based on the postulated role of fibulin 2 in the remodeling and elasticity of the vascular wall, we tested the hypothesis that fibulin 2 may be involved in regulation of blood pressure and, therefore, may be a susceptibility gene for essential hypertension and, indeed, we have shown that variations in FBLN2 gene (rs3732666 and rs1061376) are associated with reduced levels of SBP and decreased risk of hypertension.

Methods

Subjects

The study was performed in unrelated and non-selected consecutive white (Caucasian) individuals of the general population who voluntarily attended the University Clinic of Navarra for a routine medical check-up. In this general population, the individuals lack evidence of overt cardiovascular disease (i.e.

coronary artery disease, myocardial infarction, valve diseases, stroke, renal failure). The study population consisted of 344 normotensive subjects and 447 hypertensive patients. By definition, participants were considered hypertensive if they had resting SBP and/or DBP>139 and 89 mmHg, respectively, or if they were prescribed antihypertensive medication. The percentage of hypertensive patients receiving antihypertensive medication reflects what would be observed in a general population in Spain. Resting blood pressure was measured three times using a mercury sphygmomanometer and the mean of these three readings was used in subsequent statistical analyses. All patients had appropriate clinical and laboratory evaluations to exclude secondary hypertension. In accord with our Institution's guidelines and the Helsinki Declaration, subjects were informed of the research nature of the study and gave written consent prior to participation. The study was approved by the Ethics Committee of the University Clinic of Navarra.

SNP Selection and Genotyping

We selected fibulin 2 (FBLN2) as a candidate gene involved in blood pressure. We genotyped 4 tag single nucleotide polymorphisms (SNP) in a case-control study sample powered to detect association to rare alleles with an effect size (odds ratio) of 0.7 for hypertension and of 2% of the phenotypic variance for SBP and DBP. The international HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to select the 4 tag SNPs. SNPs were selected for having high minor allele frequency (MAF), for being in different linkage disequilibrium structure and, if possible, for having functional variant status. We selected one non-synonymous SNP located in exon 2 (rs3732666, ser361gly), one intronic SNP (rs1878173) and two synonymous SNPs located in exon 13 and exon 18 (rs4684968 and rs1061376), respectively. These SNPs account for a total of 35% common variation in the FBLN2 gene.

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes isolated from anticoagulated venous blood using the QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN Iberia SL, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions.

All four SNPs were genotyped using Sequenom's MassARRAY platform using the iPLEX Gold protocol as specified by the manufacturer (Sequenom Inc., San Diego, CA) [40]. The call rates for the SNPs were greater than 97%. Genotypes for 5 of the samples were confirmed using duplicate SEQUENOM® runs and showed 100% consistency. Genotyping was performed at the Spanish National Genotyping Center.

Intima-media Thickness

Ultrasound measurements of the common carotid arteries (CCA) were performed as previously reported [41]. Briefly, measurement of carotid intima-media thickness (IMT) was made 1 cm proximal to the carotid bulb of each CCA at plaque-free sites. For each individual, the IMT was determined as the average of near-wall and far-wall measurements of each CCA. Subjects were examined by the same 2 certified ultrasonographers who were blinded with respect to the individual's clinical provenance. The intraobserver and interobserver coefficients of variation of analyses were 5% and 10%, respectively.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software version 15 for Windows (Statistical Package for the Social Science, SPSS Ins. Chicago, IL). Power analysis was performed using Genetic Power Calculator [42]. Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and for allele associations were performed with the De Finetti program (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1>).

Table 1. Clinical characteristics in control subjects and hypertensive individuals.

	Control	Hypertensive	P value
Gender; male/female	256/88	345/102	>0.05
Age; years	48.97±11.7	58.3±9.9	<0.001
Body mass index; kg/m ²	26.9±4.3	29.03±4.2	<0.001
Smokers; n	109	134	>0.05
Diabetics; n	33	69	<0.05
Systolic blood pressure; mmHg	114.4±12	146.9±19.4	<0.001
Diastolic blood pressure; mmHg	74.9±7.4	88.3±10.2	<0.001
Pulse pressure; mmHg	39.6±10.3	58.5±16.5	<0.001
Glucose; mg/dL	102.3±24.5	107.4±27	<0.01
Total cholesterol; mg/dL	218.1±42.1	224.3±43	<0.05
HDL cholesterol; mg/dL	53.6±14.7	50.2±13.1	<0.01
LDL cholesterol; mg/dL	143.2±39.5	149.6±37.3	<0.05
Triglycerides; mg/dL	111.8±89.5	130.2±73.2	<0.01
C-reactive protein; mg/dL	0.39±1.7	0.49±0.97	>0.05
Fibrinogen; mg/dL	262.2±92.3	270.5±114.2	>0.05
Antihypertensive medication			
ACE inhibitor; n (%)		106 (23.71)	
ARA; n (%)		66 (14.77)	
Other antihypertensive drugs; n (%)		126 (28.19)	

Data are presented as means ± standard deviation. Glucose, C-reactive protein, fibrinogen and lipids levels were measured in serum. HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; ACE: angiotensin converting enzyme; ARA: angiotensin II type 1-receptor antagonist.
doi:10.1371/journal.pone.0043051.t001

Table 2. Genotype results.

SNP	Genotype frequencies			Genotype associations			
	Controls	HTA	P	Model	OR	95% CI	P
rs3732666exon 2	AA	177(56.4)	0.06				
	AG	121(38.5)		AG	1	0.72	0.52 to 0.97
				2	0.8	0.56 to 1.13	0.59
	GG	16(5.1)		GG	1	0.61	0.29 to 1.22
rs1878173intron 2			0.77	2	0.5	0.23 to 1.12	0.82
	GG	91(27.3)					
	GA	168(50.5)		GA	1	1.13	0.78 to 1.63
	AA	74(22.2)		AA	1	1.01	0.66 to 1.52
rs4684968exon 13	CC	147(44.1)	0.73				
	CT	148(44.4)		CT	1	1.06	0.65 to 1.72
				TT	1	1.19	0.73 to 1.92
	TT	38(11.4)					0.47
rs1061376exon 18	CC	150(44.9)	0.024				
	CT	138(41.3)		CT	1	1.03	0.76 to 1.39
				2	0.84	0.61 to 1.18	0.33
	TT	46(13.8)		TT	1	0.53	0.32 to 0.87
				2	0.47	0.27 to 0.82	0.008

Genotype frequencies are expressed as total number (%). Genotype associations are estimates of the effect of the SNPs on hypertension phenotype. Estimates were assessed using logistic regression applied to the overall population (n = 791). Model 1 is a crude model while model 2 is adjusted for gender, age, BMI, and smoking. Homozygote of the major allele was considered the reference category. HTA: hypertensive.
doi:10.1371/journal.pone.0043051.t002

pl). Continuous variables are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Differences in clinical and metabolic variables between controls and hypertensive patients were tested by one-way analysis of variance (ANOVA). The χ^2 test was used to assess statistical significance of differences in categorical variables. Logistic regression was used to assess the association of genotype with hypertension, while linear regression was used for analysis of continuous variables (SBP and DBP). Logistic and linear analyses were conducted initially using a crude model without adjustment for covariates and without considering any interaction and, subsequently, using a multivariable model adjusted for age, gender, BMI, and smoking. We adjusted for antihypertensive therapy by adding 15 mmHg to SBP and 10 mmHg to DBP. In the multivariable model, all first-order interactions between the SNPs and age, gender, BMI, and smoking were taken into account. First-order interactions were evaluated by the Fisher test. Since the model of inheritance of the SNPs studied is not known, we tested the association analysis without specifying the genetic model, and with no assumptions of specific relationships among genotypes. However, due to the low number of GG subjects in rs3732666, the GG and GA genotypes were pooled and a dominant genetic model was applied. We used stepwise multiple regression analysis to test for associations between the IMT and the selected SNPs and other measured variables. Probability values <0.05 were considered significant.

Results

Clinical and biometric characteristics of the study subjects are shown in Table 1. Compared to normotensive control individuals, hypertensive patients exhibited significantly higher values of age, BMI, SBP, DBP, pulse pressure, glucose, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides and frequency of diabetes.

Genotype and Allelic Frequencies

All four SNPs were in HWE in the overall population as well as in the hypertensive and control groups. Two of the tag SNPs (rs3732666 and rs1061376) showed evidence of an association with essential hypertension. For rs3732666, the MAF was significantly lower in hypertensive patients than in control subjects (0.19 vs. 0.24; $p = 0.022$) with an odds ratio (OR) for having the protective allele (G) of 0.75 (95%CI: 0.58 to 0.96; $p = 0.022$). MAF of rs1061376 showed a trend towards a lower frequency in hypertensive patients [0.3 vs. 0.34; OR (T) = 0.83 (95%CI: 0.66 to 1.02; $p = 0.07$)]. The differences reached statistical significance (0.30 vs. 0.36; $p = 0.029$) among men, with an OR for having the protective allele (T) in control males of 0.76 (95%CI: 0.59 to 0.97; $p = 0.029$). No statistically differences in allelic frequencies were observed for rs1878173 and for rs4684968.

Comparisons of genotype frequency distributions (Table 2) showed a significant difference for rs1061376 with a decrease in TT genotype in the hypertensive group (7.7% of the patients vs. 13.8% of the controls, $p = 0.024$). In addition, for rs3732666, we observed a trend toward a decrease in GG and AG genotypes in the hypertensive group. The differences between the hypertensive and control groups reached statistical significance ($p = 0.022$) when GG and AG genotypes were pooled.

The other two SNPs tested (rs1878173 and rs4684968) showed no evidence of association with hypertension/blood pressure (Table 2) and, hence, further statistical analyses focused only on rs3732666 and rs1061376.

Association of rs3732666 (exon 2) with SBP, DBP, and Essential Hypertension

For SBP, the β coefficients in the linear regression crude model showed that carriers of allele G (AG+GG), compared to AA homozygotes, had a significantly lower SBP of

Table 3. Estimates of the effect of the rs3732666 and rs1061376 on SBP and DBP phenotypes.

	Systolic Blood Pressure			Diastolic Blood Pressure		
	β	95%CI	P	β	95%CI	P
Rs3732666						
Model 1						
AG+GG	-4.95	-8.94 to -0.96	0.015	-2.09	-4.08 to -0.11	0.039
Model 2						
AG+GG	-3.6	-7.18 to -0.31	0.048	-1.31	-3.14 to 0.51	0.158
Model 2						
35 years of age						
AG+GG	-6.83	-12.84 to -0.84	0.026			
45 years of age						
AG+GG	-5.94	-10.37 to -1.50	0.009			
55 years of age						
AG+GG	-3.37	-6.95 to 0.2	0.064			
65 years of age						
AG+GG	0.15	-4.6 to 4.91	0.95			
Rs1061376						
Model 1						
CT	1.65	-2.33 to 5.63	0.41	0.45	-1.52 to 2.43	0.65
TT	-8.34	-14.86 to -1.83	0.012	-3.58	-6.81 to -0.34	0.03
Model 2						
CT	-0.56	-4.13 to 3.02	0.75	-0.47	-2.3 to 1.35	0.61
TT	-7.91	-13.73 to -2.07	0.008	-3.69	-6.67 to -0.71	0.015

Estimates were derived applying linear regression to the overall population (n=791). For both genotypes, model 1 is a crude model while model 2 is adjusted for gender, age, BMI, and smoking. For rs3732666, SBP and DBP measurements in AA and AG+GG genotypes were 134.98 and 130.47, and 83.40 and 81.65 mmHg, respectively. For rs1061376, SBP and DBP measurements in CC, CT, and TT genotypes were 133.38, 134.38, and 125.75 and 82.92, 82.97, and 79.69 mmHg, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0043051.t003

-4.95 mmHg (95%CI: -8.94 to -0.96; p=0.015) (Table 3). When adjusted for potential confounding factors (gender, age, BMI, and smoking) and first-order interactions (genotype*gender, genotype*age, genotype*BMI and genotype*smoking), the effect of the genotype remained significant, having the AG+GG individuals an adjusted β coefficient of -3.6 (95%CI: -7.18 to -0.31; p=0.048). The linear regression model also showed significant interaction of rs3732666 with age (p=0.003). Because of this interaction, the effect of the genotype (described above) is the overall mean effect and this need to be evaluated further at different ages. Hence, the model adjusted for gender, age, BMI, and smoking was re-applied at four representative ages of the study population (35, 45, 55, and 65 years) (Table 3). We observed that, relative to the common AA genotype, the effect of being a carrier of allele G on SBP decreased as age increased. This effect was significant at younger ages (35 and 45 years) with values that were -6.83 and -5.94 mmHg lower,

respectively. At older ages (55 and 65 years) the effect lost statistical significance (Table 3; see β coefficients).

For DBP, although the crude model showed a significant β coefficient for G carriers, this effect was lost when adjusted for gender, age, BMI, and smoking (Table 3).

For the dichotomous trait of hypertension, the logistic regression using the crude model showed that, compared to AA homozygotes, carriers of the G allele had a significantly decreased odds for hypertension (OR=0.71; 95%CI: 0.52 to 0.95; p=0.021) (Figure 1, model 1). Logistic regression analyses showed a significant interaction of rs3732666 with age (p=0.02). Therefore, the model was adjusted for gender, age, BMI, and smoking and was re-applied at the four representative ages of the study population (Figure 1, model 2). We observed that the protective effect of rs3732666 was significant at younger ages. Hence, in 35 year old individuals, relative to AA genotype, the OR was 0.38 for carriers of the G allele (95%CI: 0.18 to 0.79; p=0.01). When the model was applied at 45 years of age, the OR was still statistically significant (OR=0.55; 95%CI: 0.35 to 0.87; p=0.011). The genotype effect did not reach statistical significance at 55 and 65 years old.

Association of rs1061376 (exon 18) with SBP, DBP, and Essential Hypertension

Crude linear regression models for SBP and DBP were applied (Table 3, model 1). As shown by the β coefficients of the models, using CC genotype as reference, the TT homozygotes had a lower SBP of -8.34 mmHg (95%CI: -14.86 to -1.83; p=0.012) and a lower DBP of -3.58 mmHg (95%CI: -6.81 to -0.34; p=0.03). This effect was confirmed when the model was adjusted for gender, age, BMI, and smoking (Table 3, model 2). No statistically significant effects were observed for CT heterozygotes and there were no significant first-order interactions.

For the dichotomous trait of hypertension, the logistic regression crude model (Figure 1, model 1) and the model adjusted for gender, age, BMI, and smoking (Figure 1, model 2) showed that, compared to major CC homozygotes, TT homozygotes had significantly decreased odds for hypertension (crude OR=0.53; 95%CI: 0.32 to 0.87; p=0.012 and adjusted OR=0.47; 95%CI: 0.27 to 0.82; p=0.008). CT heterozygotes showed no statistically significant effect, and no significant first-order interactions were observed.

Association of rs3732666 and rs1061376 with IMT

For rs3732666, stepwise multiple regression analysis showed that the presence of a G allele was an independent predictor of the mean IMT of the right CCA. Additionally, following adjustment for various confounding factors (gender, age, BMI, and smoking), AG heterozygotes had a significant 0.032 mm decrease in IMT compared with AA homozygotes (p=0.044). We did not observe any statistically significant effect for GG genotype. Further, as depicted in Figure 2, we observed, in carriers of the G allele, a reduction in mean IMT of right and left CCA; albeit statistically significant only for the right carotid artery. This effect was confirmed when adjusted for gender, BMI, and smoking. For rs1061376 we observed a reduction, albeit statistically non-significant, in mean IMT of right and left CCA in TT homozygotes (data not shown).

Discussion

In this candidate gene study, we have shown that variations in FBLN2 gene (rs3732666 and rs1061376) are associated with lower levels of SBP and decreased risk of hypertension. These two traits

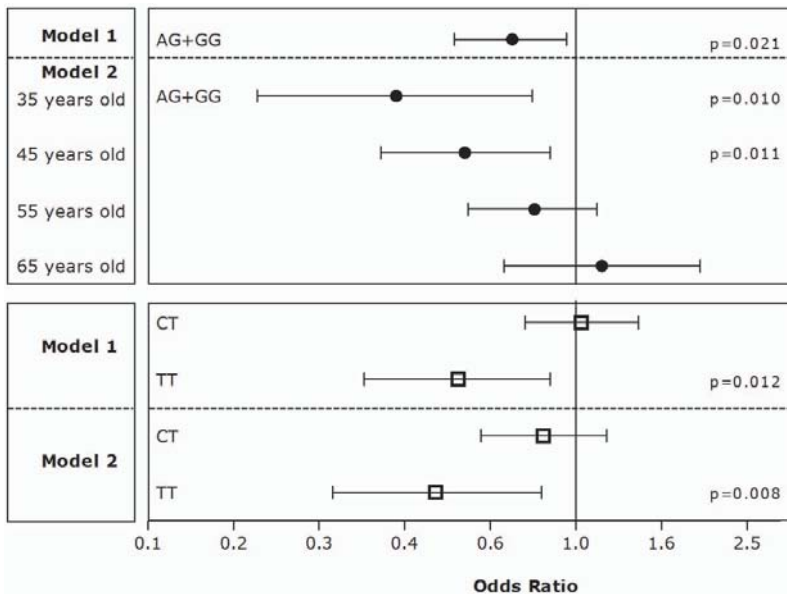


Figure 1. Estimates of the effect of the rs3732666 (black circles) and rs1061376 (white squares) on hypertension phenotype. Estimates were assessed using logistic regression applied to the overall population (n=791). For both genotypes, model 1 is a crude model while model 2 is adjusted for gender, age, BMI, and smoking.
 doi:10.1371/journal.pone.0043051.g001

are well-established risks factors for atherosclerosis and cardiovascular diseases [1,2]. We have also shown that the presence of a G allele (rs3732666) was an independent predictor of the mean IMT of the right CCA, and that it was associated, to different degrees, with lower mean IMT of CCA.

The data for rs3732666 is consistent with a dominant effect whereas for rs1061376 the data showed a recessive effect since two copies of the minor allele were needed to have an effect on blood pressure. The results for rs3732666 showed an interaction with age for SBP and HTA traits. Conversely, rs1061376 did not show any first-order interactions.

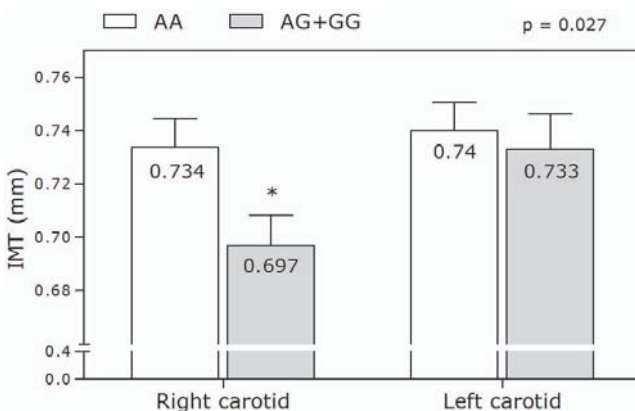


Figure 2. Association in the total population of rs3732666 (exon 2) with right and left carotid mean intima media thickness (IMT).
 doi:10.1371/journal.pone.0043051.g002

The potentially protective role of the FBLN2 SNPs is free of confounding factors since the association was maintained following adjustment for confounding variables such as age, gender, BMI and smoking; factors that have a major contribution to blood pressure variability. We adjusted for antihypertensive therapy by adding 15 mmHg to SBP and 10 mmHg to DBP. This approach has been widely used and has been shown to be a better option than ignoring the treatment or excluding subjects who are on therapy [43].

Candidate gene association studies have the advantage that genes can be selected based on known or suspected disease pathways, enabling the investigation of potential causal pathways between the genetic markers selected and complex diseases. Finding an association provides information about its functionality within that pathway. Conversely, many variants identified by GWAS are, often, distant from a protein-coding gene and thus may not have known functional consequences. However, the advantage is that the analysis is not hypothesis driven and, as such, any associations observed would point towards novel areas warranting further investigation.

Whether the effect on SBP associated with rs3732666 and rs1061376 is sufficient to decrease cardiovascular disease risk is beyond the remit of our study. However, we could postulate such an effect if we take into account the study by Lewington et al. in which a decrease in 2 mmHg was shown to be associated with a 7% and a 10% reduction in CAD and stroke mortality, respectively [1]. Further, in our study the effects on SBP associated with the SNPs studied were within the range of values shown to produce positive changes in cardiovascular disease and stroke risk in populations [1,44]. Some studies have shown small genetic effects on SBP that would be difficult to detect in the clinic. However, in our study we observed effects in the range of 6 to 14 mmHg; values that would have an effect at the individual level and, as such, would warrant further prospective studies. For instance, it is estimated that in patients with stage 1 hypertension (SBP 140–159 mmHg and/or DBP 90–99 mmHg) with at least one additional cardiovascular disease risk factor, achieving a sustained 12 mmHg reduction in SBP over 10 years will prevent 1 death for every 11 patients treated [45]. One limitation of our study is that the associations described apply only to a white Caucasian population. Given the well-documented differences in incidence of hypertension in various ethnic groups [46,47] and the significantly different allele distributions at some SNP markers between major ethnic groups, new studies in other populations should be performed to ascertain whether our results can be generalized. In addition, sample size is always an issue to be considered in association studies. Hence, bigger sample sizes or other hypertensive populations would be necessary to corroborate these findings.

The underlying mechanisms by which variations in FBLN2 gene might affect blood pressure are not known. The rs3732666 SNP encoded in exon 2 involves a missense change of an adenine (A) for a guanine (G) which results in a serine to glycine change in aminoacid 361 in the cysteine-free domain of the expressed protein. Changes from serine to glycine residues in other proteins have been shown to result in changes in the affinity, structure, and function of the mature protein [48]. Further, the lack of a serine residue in fibulin 2 precludes functions of the protein associated with serine aminoacids. For instance, these aminoacids have a side chain that can undergo O-linked glycosylation and are commonly phosphorylated by kinases during cell signaling[49–51]. Conversely, rs1061376 is a single base change of cytosine (C) to thymine (T) in exon 18 that leads to a synonymous aminoacid (aspartic acid) substitui-

tion in position 1204. Hence, no change in aminoacid is observed and thus no correlation with changes in fibulin 2 functionality would be expected. However, we would expect functional variants around, (or in linkage disequilibrium with) this variant, to be associated with both SBP and HTA.

Overall, genetic variation can contribute to altered blood pressure regulation by altering the structure of fibulin 2 or by altering FBLN2 gene expression. Fibulin 2 is an important component of the vascular extracellular matrix and, hence, can influence the organization and structure of the vascular wall[24–27]. Additionally, fibulin 2 can bind to tropoelastin [32] and to fibrillin-1 [27], suggesting that fibulin 2 not only is a scaffold protein but may also function as an anchor for elastin to microfibrils. Also, there is evidence of a regulatory function of fibulin 2 because it can inhibit smooth muscle cell migration [52]. Hence, we can hypothesize that different concentrations of fibulin 2 or a change in its structure may contribute to the development of hypertension, either by stiffening the vascular wall or by altering cellular signal transduction. A change in structure of fibulin 2 may prevent an appropriate build-up of elastic fibers and a correct assembly of the extracellular matrix in the vascular wall; the consequence being an alteration in the structure of the vascular wall that favors hypertension. Our results are in accord with this hypothesis since we only found an association of fibulin 2 with SBP, while SBP was related to an increase in central vascular stiffness. A compensatory function of fibulin 1 needs to be ruled out since it has been shown (in FBLN2 deficient mice) that the lack of fibulin 2 is compensated-for by an increased expression of fibulin 1 which is associated with normal elastic fiber formation [53]. Further, the SNPs analyzed in the present study do not lead to fibulin 2 deficiency but are likely to lead to functional alterations of less impact. As such, it is conceivable that they do not lead to fibulin 1 compensation and may have moderate, but biologically significant, effect.

Our results may provide the first evidence for FBLN2 as a new gene associated with hypertension. We hypothesize that changes either in the structure of fibulin 2, or in its quantitative levels, could be a new mechanism leading to hypertension. Further studies are needed to clarify this point. In addition, even in the absence of a precise underlying molecular mechanism, our results are especially interesting in SBP regulation since there are few protein targets identified for therapeutic intervention, to-date.

Perspectives

Our results may provide the first evidence for FBLN2 as a new gene associated with hypertension. We believe that changes either in the structure of fibulin 2, or in its quantitative levels, could be a new mechanism leading to hypertension. Further studies are needed to clarify this point. In addition, even in the absence of a precise underlying molecular mechanism, the identification of this new association may shed further light on new disease mechanisms, especially with respect to SBP regulation since, to-date, there have been few target proteins identified for therapeutic intervention.

Acknowledgments

We appreciate the genotyping services provided by the Spanish National Genotyping Center (<http://www.cegen.org>) and the Instituto de Salud Carlos III (PI030786 and PI10/02547).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JCV NS JR LM. Performed the experiments: JCV NS. Analyzed the data: JCV NS. Contributed reagents/

References

- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360: 1903–1913.
- Laves CM, Vander Hoorn S, Rodgers A (2008) Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* 371: 1513–1518.
- Cooperative Study (1967) Effects of treatment on morbidity in hypertension. Results in patients with diastolic blood pressures averaging 115 through 129 mm Hg. *JAMA* 202: 1028–1034.
- SHEP Cooperative Research Group (1991) Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *JAMA* 265: 3255–3264.
- Whelton PK, He J, Appel LJ, Cutler JA, Havas S, et al. (2002) Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. *Jama* 288: 1882–1888.
- Havlik RJ, Garrison RJ, Feinleib M, Kannel WB, Castelli WP, et al. (1979) Blood pressure aggregation in families. *Am J Epidemiol* 110: 304–312.
- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, et al. (1997) A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 336: 1117–1124.
- Stevens VJ, Obarzanek E, Cook NR, Lee IM, Appel LJ, et al. (2001) Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II. *Ann Intern Med* 134: 1–11.
- Dumler F (2009) Dietary sodium intake and arterial blood pressure. *J Ren Nutr* 19: 57–60.
- Lacolley P, Challande P, Osborne-Pellegrin M, Regnault V (2009) Genetics and pathophysiology of arterial stiffness. *Cardiovasc Res* 81: 637–648.
- Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, et al. (2009) Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet* 41: 666–676.
- Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, et al. (2009) Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet* 41: 677–687.
- Rafiq S, Anand S, Roberts R (2010) Genome-wide association studies of hypertension: have they been fruitful? *J Cardiovasc Transl Res* 3: 189–196.
- Lemarie CA, Tharaux PL, Lehoux S (2010) Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 48: 433–439.
- DiBona GF (2002) Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 197–200.
- Sharma AM, Engeli S (2006) The role of renin-angiotensin system blockade in the management of hypertension associated with the cardiometabolic syndrome. *J Cardionetab Syndr* 1: 29–35.
- Sharma JN (2009) Hypertension and the bradykinin system. *Curr Hypertens Rep* 11: 178–181.
- Hermann M, Flammer A, Luscher TF (2006) Nitric oxide in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8: 17–29.
- Touyz RM (2000) Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure—implications in the pathogenesis of hypertension. *Can J Cardiol* 16: 1137–1146.
- Hultgardh-Nilsson A, Durbeek M (2007) Role of the extracellular matrix and its receptors in smooth muscle cell function: implications in vascular development and disease. *Curr Opin Lipidol* 18: 540–545.
- Briones AM, Arribas SM, Salasica M (2010) Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 187–194.
- Pan TC, Sasaki T, Zhang RZ, Fassler R, Timpl R, et al. (1993) Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding. *J Cell Biol* 123: 1269–1277.
- Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu ML (2003) Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 479–489.
- Sasaki T, Gohring W, Pan TC, Chu ML, Timpl R (1995) Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *J Mol Biol* 254: 892–899.
- Olin AI, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D, et al. (2001) The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem* 276: 1253–1261.
- Utani A, Nomizu M, Yamada Y (1997) Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences. *J Biol Chem* 272: 2814–2820.
- Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu ML, et al. (1996) Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem* 271: 19489–19496.
- Misogoe N, Gotz W, Sasaki T, Chu ML, Timpl R, et al. (1996) The extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 in the early human embryo. *Histochem J* 28: 109–116.

materials/analysis tools: JV NS GZ AF OB JR RF LM. Wrote the paper: JCV NS JR RF LM.

- Fassler R, Sasaki T, Timpl R, Chu ML, Werner S (1996) Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing of normal and glucocorticoid-treated mice. *Exp Cell Res* 222: 111–116.
- Yi CH, Smith DJ, West WW, Hollingsworth MA (2007) Loss of fibulin-2 expression is associated with breast cancer progression. *Am J Pathol* 170: 1535–1545.
- Lemaire R, Korn JH, Schiemann WP, Lafyatis R (2004) Fibulin-2 and fibulin-5 alterations in tsk mice associated with disorganized hypodermal elastic fibers and skin tethering. *J Invest Dermatol* 123: 1063–1069.
- Yanagisawa H, Davis EC (2010) Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1084–1093.
- Chapman SL, Sicot FX, Davis EC, Huang J, Sasaki T, et al. (2010) Fibulin-2 and fibulin-5 cooperatively function to form the internal elastic lamina and protect from vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 68–74.
- Liu YF, Chen WM, Lin YF, Yang RC, Lin MW, et al. (2005) Type II collagen gene variants and inherited osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med* 352: 2294–2301.
- Flamant M, Placier S, Dubroca C, Esposito B, Lopes I, et al. (2007) Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension* 50: 212–218.
- Lee HW, Karam J, Hussain B, Winer N (2008) Vascular compliance in hypertension: therapeutic implications. *Curr Diab Rep* 8: 208–213.
- Brilla CG, Maich B, Weber KT (1992) Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension. *Eur Heart J* 13 Suppl D: 24–32.
- Payne RA, Wilkinson IB, Webb DJ (2010) Arterial stiffness and hypertension: emerging concepts. *Hypertension* 55: 9–14.
- London GM (1997) Large arteries haemodynamics: conduit versus cushioning function. *Blood Press Suppl* 2: 48–51.
- Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, Shi T, van den Boom D (2009) Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol* 578: 307–343.
- Zalba G, Belouqui O, San Jose G, Moreno MU, Fortunio A, et al. (2005) NADPH oxidase-dependent superoxide production is associated with carotid intima-media thickness in subjects free of clinical atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1452–1457.
- Purcell S, Cherny SS, Sham PC (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19: 149–150.
- Tobin MD, Sheehan NA, Scurrah KJ, Burton PR (2005) Adjusting for treatment effects in studies of quantitative traits: antihypertensive therapy and systolic blood pressure. *Stat Med* 24: 2911–2935.
- Stamler J, Rose G, Stamler R, Elliott P, Dyer A, et al. (1989) INTERSALT study findings. Public health and medical care implications. *Hypertension* 14: 570–577.
- Jones DW, Hall JE (2004) Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure and evidence from new hypertension trials. *Hypertension* 43: 1–3.
- Howard G, Prineas R, Moy C, Cushman M, Kellum M, et al. (2006) Racial and geographic differences in awareness, treatment, and control of hypertension: the REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke study. *Stroke* 37: 1171–1178.
- Kramer H, Han C, Post W, Goff D, Diez-Roux A, et al. (2004) Racial/ethnic differences in hypertension and hypertension treatment and control in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Am J Hypertens* 17: 963–970.
- Giroux MJ, Morris CF (1998) Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the fibrillin components puroindoline a and b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6262–6266.
- Fritsche L, Neukamm SS, Lehmann R, Kremmer E, Hennige AM, et al. (2010) Insulin-induced serine phosphorylation of IRS-2 via ERK1/2 and mTOR: studies on the function of SER 675 and SER 907. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Epub ahead of print].
- Eom TY, Jope RS (2009) Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3alpha/beta impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol Psychiatry* 66: 494–502.
- Schultheis M, Diestel S, Schmitz B (2007) The role of cytoplasmic serine residues of the cell adhesion molecule L1 in neurite outgrowth, endocytosis, and cell migration. *Cell Mol Neurobiol* 27: 11–31.
- Strom A, Olin AI, Aspegren A, Hultgardh-Nilsson A (2006) Fibulin-2 is present in murine vascular lesions and is important for smooth muscle cell migration. *Cardiovasc Res* 69: 755–763.
- Sicot FX, Tsuda T, Markova D, Klement JF, Arita M, et al. (2008) Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. *Mol Cell Biol* 28: 1061–1067.

2. ESTUDI 2 (SIMVASTATIN INCREASES FIBULIN-2 EXPRESSION IN HUMAN CORONARY ARTERY SMOOTH MUSCLE CELLS VIA RHOA/RHO-KINASE SIGNALING PATHWAY INHIBITION)

RESEARCH ARTICLE

Simvastatin Increases Fibulin-2 Expression in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells via RhoA/Rho-Kinase Signaling Pathway Inhibition

Noemí Serra, Roser Rosales, Lluís Masana, Joan-Carles Vallvé*

Facultat de Medicina, Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Catalonia, Spain

* jc.vallve@urv.cat



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Serra N, Rosales R, Masana L, Vallvé J-C (2015) Simvastatin Increases Fibulin-2 Expression in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells via RhoA/Rho-Kinase Signaling Pathway Inhibition. PLoS ONE 10(7): e0133875. doi:10.1371/journal.pone.0133875

Editor: Pablo Garcia de Frutos, IIBB-CSIC-IDIBAPS, SPAIN

Received: November 25, 2014

Accepted: July 2, 2015

Published: July 24, 2015

Copyright: © 2015 Serra et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, [FIS PI030786]; and Centro de Investigación Biomédica de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The composition and structure of the extracellular matrix (ECM) in the vascular wall and in the atherosclerotic plaque are important factors that determine plaque stability. Statins can stabilize atherosclerotic plaques by modulating ECM protein expression. Fibulins are important components of the ECM. We evaluated the in vitro effect of simvastatin on the expression of fibulin-1, -2, -4 and -5 in human coronary artery smooth muscle cells (SMCs) and the mechanisms involved. Cells were incubated with simvastatin (0.05–1 μ M), mevalonate (100 and 200 μ M), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) (15 μ M), farnesyl pyrophosphate (FPP) (15 μ M), the Rho kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 (15 and 20 μ M), the Rac-1 inhibitor (another member of Rho family) NSC23766 (100 μ M), arachidonic acid (a RhoA/ROCK activator, 25–100 μ M) and other fatty acids that are not activators of RhoA/ROCK (25–100 μ M). Gene expression was analyzed by quantitative real-time PCR, and fibulin protein levels were analyzed by western blotting and ELISA. Simvastatin induced a significant increase in mRNA and protein levels of fibulin-2 at 24 hours of incubation ($p < 0.05$), but it did not affect fibulin-1, -4, and -5 expression. Mevalonate and GGPP were able to reverse simvastatin's effect, while FPP did not. In addition, Y-27632, but not NSC23766, significantly increased fibulin-2 expression. Furthermore, activation of the RhoA/ROCK pathway with arachidonic acid decreased fibulin-2 mRNA. Simvastatin increased mRNA levels and protein expression of the ECM protein fibulin-2 through a RhoA and Rho-Kinase-mediated pathway. This increase could affect the composition and structure of the ECM.

Introduction

Atherosclerosis, the primary underlying cause of cardiovascular diseases, is a systemic disease of the arterial wall that leads to plaque development[1, 2]. During the progression of atherosclerosis, the structure, abundance, and composition of the arterial wall extracellular matrix

(ECM) are deeply affected[3]. Moreover, the progression of plaque can lead to a so-called vulnerable-type plaque, characterized by a thin fibrous cap and intraplaque neovascularization and hemorrhage[4, 5] among other factors. The breakdown of ECM components (collagen, elastin, and others) by extracellular proteases in atherosclerotic plaques promotes fibrous cap thinning and destabilization[6, 7], which has been associated with major adverse clinical outcomes[8], such as myocardial infarction and stroke[4, 9, 10]. Intraplaque neovascularization is characterized by new immature and thin-walled micro-vessels derived from the adventitial vasa vasorum. The consequence of this reduced wall structure is a fragile network of new vessels that can easily rupture, causing intraplaque hemorrhage[11]. Furthermore, an increased density of these immature micro-vessels has been identified at the shoulders of atherosclerotic lesions where rupture is more frequently described[12–14].

Fibulins are a family of seven proteins that are important components of the ECM[15, 16], basement membranes[17] and elastic matrix fibers[18]. Exhibiting an extensive array of protein–protein interactions, fibulins act as intermolecular bridges between ECM components, connecting various supramolecular structures. Fibulins participate in the correct assembly of elastin and microfibrils to form elastic fibers. For instance, fibulin-1 and -2 bind to tropoelastin and proteoglycans, and fibulin-5 binds to tropoelastin and elastin fibers[19, 20]. Moreover, fibulin-2 binding to fibronectin and collagen in the basement membrane has been described [21]. Therefore, fibulins have an important structural function in the arterial wall and in different types of connective tissues. The dysregulation of certain fibulins occurs in a range of human disorders[22–27]. Moreover fibulin-2 has been shown to colocalize with versican and hyaluronan in murine vascular atherosclerotic lesions[28].

Statins comprise a class of hypocholesterolemic agents used in people with or at risk for cardiovascular disease. They lower cholesterol by inhibiting HMG-CoA reductase, but in addition, statins have a wide range of pleiotropic effects[29–31], including the stabilization of atherosclerotic plaques[32, 33]. In this regard, it has been shown that statin therapy in animal models modifies the biology of the atherosclerotic plaque and increases its stability[34]. Moreover, collagen and fibrotic content of plaques significantly increases in patients receiving statin treatment, conferring resistance to rupture and plaque stabilization[35–39]. Some of these non-lipid related actions may be explained by the inhibition of several intracellular pathways, including kinases and small G proteins [30, 40, 41]. Statins inhibit posttranslational modifications of GTPases such as RhoA and Rac1 through the inhibition of isoprenoid intermediates of the cholesterol pathway, such as farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) [40]. RhoA function is regulated through the activation of the Rho-kinase (ROCK) pathway, which is also inhibited by statins and can be activated by arachidonic acid (AA), a polyunsaturated omega-6 fatty acid[42, 43], but not by other types of fatty acids.

The effect of statins on the expression of fibulin family members has not yet been examined. Therefore, the aim of our study was to evaluate whether simvastatin could modify the expression of 4 ECM fibulin family (fibulin-1, -2, -4, and -5) in human coronary artery smooth muscle cells (SMCs). Our results indicate that simvastatin increases the expression of fibulin-2 in human coronary artery SMCs through a RhoA/ROCK-dependent mechanism.

Methods

Reagents

Medium 231, smooth muscle growth supplement (SMGS) and gentamicin/amphotericin B solution were purchased from Cascade Biologics (Madrid, Spain). Simvastatin sodium salt was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). GGPP, FPP and fatty acids [palmitic (PA), oleic (OA), linoleic (LA), AA, eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA)]

were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Y-27632 dihydrochloride and NSC 23766 were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Human coronary artery smooth muscle cell culture

Three different lots of human coronary artery SMCs were purchased from Cascade Biologics (4C0915, 4C1284, and 886619). The donor for lot number 4C0915 was a 19-year-old male; for lot number 4C1284, a 21-year-old male; and for lot number 886619, a 36-year-old woman. The cells were cultured in medium 231 (HEPES + bicarbonate) supplemented with SMGS (fetal bovine serum (4.9% v/v), human fibroblast grow factor (2 ng/ml), human epidermal grow factor (0.5 ng/ml), heparin (5 ng/ml), insulin (5 µg/ml) and bovine serum albumin (0.2 µg/ml)) and gentamicin/amphotericin B solution at a density of 2500 cells/cm² according to the manufacturer's protocol. Cells were grown at 37°C under a humidified atmosphere and 5% CO₂. The experiments were performed when cells had grown to 80–90% confluence. The experiments were reproduced using the three different lots of cells. The lot of cells used in each experiment is stated in the Figure Legend of each Figure.

Effect of simvastatin on fibulins

Human coronary artery SMCs were incubated with a wide range of concentrations of simvastatin (0.05, 0.1, 0.5, 1 µM) for 6 or 24 hours. Depending on the objective of the experiments, cells were used for either total RNA or protein extraction. Cells incubated with vehicle alone (untreated cells) were designated as control.

Effect of mevalonate, GGPP, FPP, NCS 23766 and Y-27632 on fibulin-2 mRNA expression

Human coronary artery SMCs were pre-incubated for 2 hours with mevalonate (100 and 200 µM), GGPP (15 µM), and FPP (15 µM), and with the Rho kinase inhibitor Y-27632 (10, 15, 20 µM), and the Rac-1 inhibitor (another member of Rho family) NSC23766 (100 µM) for 24 hours. After incubation, cells were used for total RNA isolation. Cells incubated with vehicle alone (untreated cells) were designated as control. In some cases the culture media was kept at -80°C for fibulin 2 protein determination.

Preparation of Fatty acid (FA) sodium salt and FA-BSA complex

Preparation was made with some modifications according to the method of Wu et al.[44] Ten milligrams of each FA were mixed with 0.5 ml EtOH and 5 M NaOH in a 1:1 ratio volume of FA to NaOH. The mixture was dried under nitrogen gas until the FA sodium salt formed. The salt was then dissolved in 2 ml sterile water (stock solutions of FA). To avoid FA oxidation, 1 µM BHT was added to the FA stock solutions. Stock solutions of FA complexed to BSA were made by mixing FA and 5 mM BSA in a 3:1 ratio of FA to BSA. The FA-BSA solution was sterile-filtered and used fresh.

Effect of FA-BSA on fibulin-2 mRNA expression

Human coronary artery SMCs were incubated with FA-BSA at 25, 50 or 100 µM for 24 h. The fatty acids used were PA, OA, LA, AA, EPA and DHA. Cells were used for total RNA extraction. Cells incubated with vehicle alone (untreated cells) were designated as control.

Cytotoxicity

The potential cytotoxic effect of all compounds on human coronary artery SMCs was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) release in the culture medium using the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega; Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions and by observing cellular morphology (Olympus IX71; Barcelona, Spain). We did not observe any cytotoxic effect of the compounds used at the concentrations and times described.

RNA isolation

Cells were lysed in lysis buffer, and total RNA was isolated from the cells using the ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Life Technologies; Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. The absorbance at 260 nm was used to measure the RNA concentration, and the 260/280 nm absorbance ratio was used to analyze RNA quality.

Quantitative real-time polymerase chain reaction

A total of 0.5 μ g RNA was reverse transcribed to cDNA using Random Hexamers and SuperScript II (Life Technologies) following the manufacturer's protocol. Taqman primers and probes for fibulin-1, -2, -4 and -5, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 18s were obtained from validated and pre-designed Gene Expression Assays (Life Technologies) and were used in real-time polymerase chain reaction (rtPCR) amplifications. mRNA expression for each gene and sample was calculated using the recommended $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The control group (untreated cells) was defined as the calibrator in this experiment. GAPDH and 18s were used as housekeeping genes to normalize the results of the gene of interest.

Fibulin protein extraction and quantification

The culture plates were placed on ice and the medium was removed and kept at -80°C . Next, the plates were washed with phosphate buffered saline (PBS). Then, 800 μ l of PBS was added, and the cells were scraped from the surface of the culture plates with a cell filter and centrifuged at 1500 rpm for five minutes at 4°C . The supernatant was discarded. A total of 100 μ l hypotonic buffer was added, and the samples were passed through a syringe with a 26 $\frac{1}{2}$ G needle. Next, the samples were centrifuged at 16,000 \times g for 10 minutes at 4°C . The supernatant, now containing cytoplasmic extracts, was stored at -80°C . For protein quantification, a Qubit Fluorometer (Life Technologies) was used.

Secreted fibulin-2 in the cell medium was determined by commercial ELISA kits (Uscn Life Science, Inc.), according to the instructions.

Western blotting

Human coronary artery SMCs were cultured as previously described and incubated with simvastatin at concentrations of 0.05–1 μ M for 6 or 24 hours. For fibulin-1 and fibulin-2, cell extracts were denatured in 20X Tris-Acetate SDS Running Buffer, separated on Novex 3–8% Tris-Acetate gels (Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membranes (0.45 μ M). This procedure was also followed for fibulin-2 determination in the cell medium prior to concentration of the samples with Amicon 10K centrifugal filters (Millipore). For fibulin-5, cell extracts were denatured in 20X MOPS SDS Running Buffer, separated on Novex 10% Bis-Tris gels (Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membranes (0.22 μ M). The membranes were blocked in 1X Tris-buffered saline (TBS), 0.1% Tween and 4% ECL advance (Western blotting detection kit (GE Healthcare; Barcelona, Spain)) for 1 hour, washed in 1X

TBS and incubated with fibulin-1 and -5, actin (1:500) (Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Germany) or fibulin-2 (1:500) (Novus biologics; Cambridge, United Kingdom) antibodies overnight at 4°C with continuous shaking. After further washing in 10% 1x TBS, 1% SDS and 0.5% Nonidet P-40, the blots were incubated for 30 minutes with secondary anti-goat P-0049 antibodies (1:10,000) (DACO; Barcelona, Spain) for fibulin-1, fibulin-5, and actin and with secondary anti-rabbit P-0048 antibodies (1:10,000) (DACO) for fibulin-2. Bands were visualized using ECL reagents (Life Technologies) with Versadoc (Bio Rad; Barcelona, Spain), normalized to actin expression and quantified with Quantity One Analysis Software version 4.6.2.

Statistical analysis

All of the results are expressed as the Mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). The number of independent experiments conducted for each result is stated in the Figure Legends. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett post-test correction for multiple comparisons. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (San Diego, California, USA) version 5.01.

Results

Effect of simvastatin on fibulin expression

Six hours after simvastatin treatment, fibulin-1, -2, -4, and -5 mRNA levels were unchanged ([S1 Fig](#)). However, after 24 hours of treatment, simvastatin produced a significant increase in fibulin-2 mRNA levels in human coronary artery SMCs compared to controls ([Fig 1](#)). The lowest simvastatin concentration showing a significant effect was 0.1 μ M with a 1.7-fold increase in fibulin 2 mRNA levels. The maximum effect of simvastatin was at 1 μ M with a 2.9-fold increase. In addition to increasing fibulin-2 mRNA expression, simvastatin treatment also increased fibulin-2 protein expression. We quantified western blot band intensity and normalized them to actin expression and found a significant increase with a maximum effect also at a concentration of 1 μ M with a 2.1-fold increase ([Fig 1](#)). In contrast, mRNA and protein levels of fibulin-1, -4, and -5 did not change, after 24 hours of simvastatin treatment ([S1](#) and [S2](#) Tables).

Mevalonate reverses simvastatin-induced fibulin 2 expression

By inhibiting HMG-CoA reductase, statins cause a depletion of mevalonate in the cells. To determine whether this depletion was involved in simvastatin increase of fibulin 2 expression, we incubated human coronary artery SMCs with simvastatin alone (1 μ M) or in combination with mevalonate. We found that pre-incubating the cells for 2 hours with increasing concentrations of mevalonate (100, 200 μ M), completely and significantly reversed the simvastatin-dependent induction of fibulin 2 mRNA and protein ([Fig 2](#)), confirming the specificity of simvastatin's effect. Mevalonate alone did not affect fibulin 2 mRNA or protein expression. Furthermore, we showed that mevalonate alone or in combination with simvastatin did not affect fibulin -1, -4, or -5 gene expression ([S2 Fig](#)).

Effect of simvastatin on secreted fibulin-2 expression

To determine whether the intracellular effects described above for fibulin-2 were valid for secreted fibulin-2, the culture media of those experiments were analyzed by ELISA and western blotting. We found that simvastatin (1 μ M) significantly increased secreted fibulin-2 concentration ([Fig 3](#)) after 24 h of incubation and that pre-incubating the cells with mevalonate (200 μ M), completely and significantly reversed the simvastatin-dependent induction of

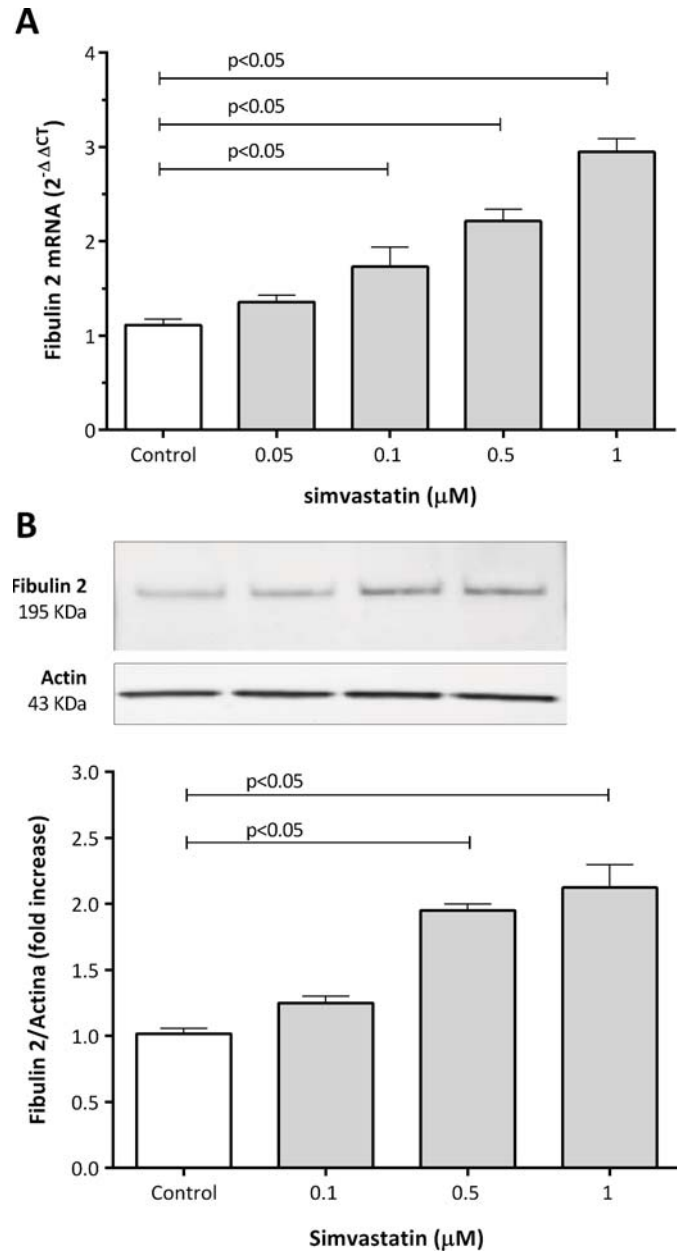


Fig 1. Effect of simvastatin on fibulin-2 mRNA (A) and protein (B) levels in human coronary artery SMCs. Cells were treated with simvastatin for 24 hours. Blot bands were normalized to actin and quantified with Quantity One Analysis Software version 4.6.2. A representative Western blot is shown. The results are shown as the mean with the standard error of the mean (SEM) for eight independent experiments in 1A (2 with cell lot number 4C0915, 3 with cell lot number 4C1284, and 3 with cell lot number 886619) and six independent experiments in 1B (2 with cell lot number 4C0915, 2 with cell lot number 4C1284, and 2 with cell lot number 886619). Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction.

doi:10.1371/journal.pone.0133875.g001

secreted fibulin protein (Fig 3). These results confirm the specificity of the effect of simvastatin and provide evidence of the secretion of fibulin-2 by these cells. Mevalonate alone did not affect soluble fibulin 2 expression.

Downstream isoprenoids are involved in simvastatin effect

Mevalonate is a precursor of isoprenoid compounds such as FPP and GGPP in the cholesterol biosynthetic pathway. To evaluate which downstream isoprenoid was involved in fibulin 2 mRNA expression, we incubated human coronary artery SMCs with simvastatin alone or in combination with one of the isoprenoids. We found that GGPP (15 μ M) but not FPP (15 μ M) markedly reversed simvastatin-induced fibulin 2 mRNA expression, whereas the respective isoprenoids alone had no effect (Fig 4A). These results were specific for fibulin 2 because no change in the mRNA levels of fibulin-1, -4, or -5 was observed after incubation of cells with isoprenoids alone or in combination with simvastatin (S3 Fig).

ROCK inhibitor Y-27632 upregulates fibulin 2 expression

Because ROCK is one of the major downstream targets of RhoA, we next evaluated in human coronary artery SMCs the involvement of the RhoA/ROCK pathway on simvastatin-induced fibulin-2 expression. As shown in Fig 4B, treatment of cells with the selective ROCK inhibitor Y-27632 significantly increased fibulin-2 mRNA levels. We found that 24 h treatment with Y-27632 at 10, 15 and 20 μ M significantly increased fibulin-2 mRNA expression by 1.5, 2.6, and 2.3-fold, respectively. In contrast, treatment with the selective Rac-1 inhibitor NSC23766 had no effect on fibulin-2 mRNA levels (Fig 4B). Again, this effect was specific for fibulin-2 because incubation of cells with different concentrations of the ROCK inhibitor did not affect the mRNA levels of any of the other fibulins tested (fibulin-1, -4, and -5) (S4 Fig).

Arachidonic acid, but not other FAs, decreases fibulin-2 gene expression

It is well known that AA, but not PA, OA, LA, EPA or DHA, activates the RhoA/ROCK pathway. Therefore, we tested whether RhoA/ROCK pathway activation with increasing AA concentrations affected fibulin 2 expression. As shown in Fig 5, AA produced a significant decrease in fibulin-2 mRNA levels compared to controls. At 50 and 100 μ M, we observed a 45% and 42% decrease, respectively. However, PA, OA, LA, EPA and DHA had no significant effect on fibulin 2 mRNA expression at any of the concentrations used (S5 Fig).

Discussion

The main objective of the current study was to evaluate whether simvastatin treatment could affect the expression of 4 fibulin family members (fibulin-1, -2, -4, and -5) and the mechanisms involved. We have shown that 24 hours of simvastatin treatment of human coronary artery SMCs upregulates intracellular and secreted fibulin-2 expression at both the mRNA and protein levels. This effect is specific to fibulin-2, as neither fibulin-1, -4 nor -5 were affected by simvastatin treatment. Moreover, we have shown that the mechanism involved is a depletion in

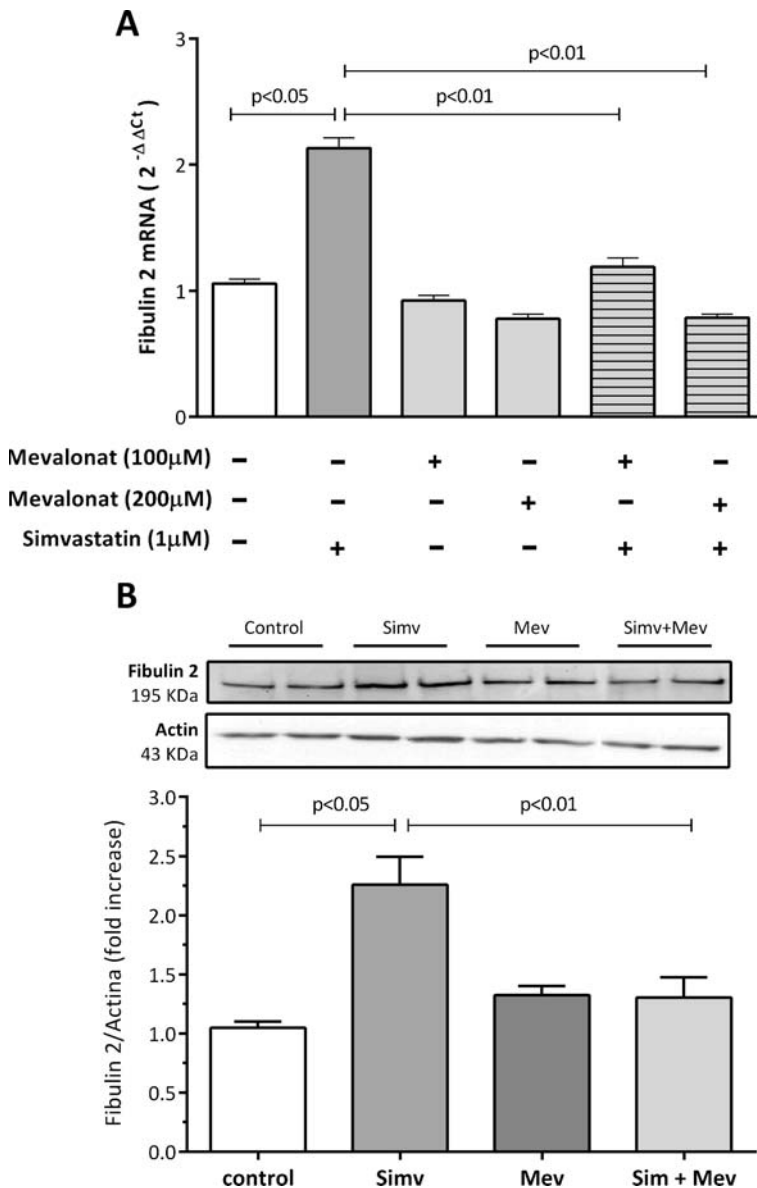


Fig 2. A: Effect of mevalonate on simvastatin-induced fibulin-2 mRNA levels in human coronary artery SMCs. Cells were preincubated for 2 hours with mevalonate (100, 200 μM) and treated with simvastatin for 24 hours. **B: Effect of mevalonate on simvastatin-induced fibulin-2 protein levels in human coronary artery SMCs.** Cells were preincubated for 2 hours with mevalonate (200 μM) and treated with simvastatin for 24 hours. Blot bands were normalized to actin and quantified with Quantity One Analysis Software version 4.6.2. A representative Western blot is shown. The results are shown as the mean with

the standard error of the mean (SEM) for twelve independent experiments in 2A (2 with cell lot number 4C0915, 4 with cell lot number 4C1284, and 6 with cell lot number 886619) and six independent experiments in 2B (2 with cell lot number 4C0915, 2 with cell lot number 4C1284, and 2 with cell lot number 886619). Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction.

doi:10.1371/journal.pone.0133875.g002

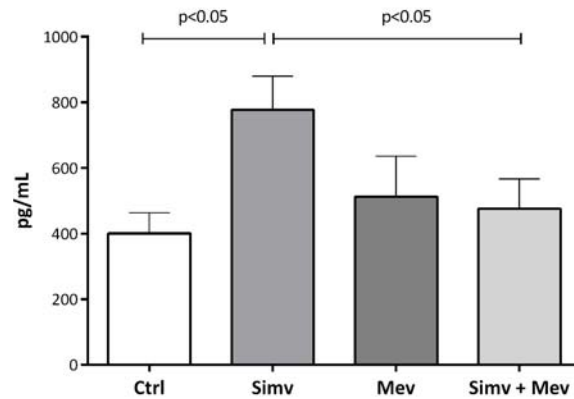
the cells of mevalonate and GGPP. Simvastatin by inhibiting the rate-limiting enzyme in the cholesterol synthesis pathway HMG-CoA reductase, decrease levels of these compounds which are intermediates of the pathway. Because GGPP is also responsible for the posttranslational activation of the small GTPase RhoA, the simvastatin-induced depletion of GGPP is linked to an inhibition of RhoA and its effector ROCK. In addition, we observed that the inhibition of ROCK was specific, as treatment with a ROCK inhibitor (Y-27632) increased fibulin-2 expression whereas treatment with a Rac inhibitor (NCS23766) did not. Furthermore, neither mevalonate nor GGPP, FPP, Y-27633, or NSC23766 affect the expression of fibulins -1, -4 or -5. We also found that the induction of RhoA/ROCK pathway with AA decreased fibulin-2 expression, while other fatty acids (PA, OA, LA, EPA and DHA) that don't induce the pathway, had no effect on fibulin 2 expression. To our knowledge, the simvastatin-induced increase in fibulin-2 expression reported here is a novel non-lipid related effect of simvastatin. Because simvastatin is a lipophilic statin, extrapolation of our results to hydrophilic statins would be just speculation. Therefore, new experiments should be performed with this type of statins to confirm these results.

Statins primarily protect against coronary disease by reducing lipid levels. However, pleiotropic effects of statins can further protect patients on statin therapy. These effects are well characterized and include improvement in endothelial dysfunction, increased nitric oxide bioavailability, antioxidant properties, reduction of blood thrombogenicity, and inhibition of pro-inflammatory responses[29–31].

Fibulin 2 has important features in connection with atherosclerosis. It is an important component of the vascular ECM and can influence the organization and structure of the vascular wall[45–48] by binding to matrix components such as proteoglycans, fibronectin, fibrillin, and laminins [17, 45, 46, 49–51]. Additionally, fibulin 2 can bind to tropoelastin and to fibrillin-1, suggesting that it may act as an anchor for elastin to microfibrils[18, 48, 52]. Moreover, it has been shown in murine models that fibulin-2 is expressed in SMC-rich regions of atherosclerotic lesions, where it colocalizes with versican and hyaluronan[28]. Moreover, it has been shown that thinning of the plaque fibrous cap and the presence of immature intraplaque neovessels are key events in the transformation of atherosclerotic plaques to a vulnerable phenotype, thus contributing to the onset of complications[53]. In this regard, an important pleiotropic effect of statins is the improvement in the characteristics that stabilizes atherosclerotic plaques[37, 39]. For instance, 12-month treatment of patients with atorvastatin has resulted in significant increases in the fibrotic content of the plaque [36]. Immunohistochemistry studies of human carotid plaques have shown that patients on pravastatin have plaques with a significant higher collagen content [35]. Moreover, 9-month statin treatment after acute myocardial infarction significantly increased the fibrous-cap thickness in patients with hyperlipidemia[38]. But fibulin-2 not only is a scaffold protein, there is also evidence that it has a regulatory function because it can modify SMC migration[28, 51]. Moreover, it has been proposed that changes in fibulin-2 structure or levels may partially control systolic blood pressure[54]. Overall, the role of fibulin-2 in the atherosclerotic process needs to be clarified with more studies.

We describe a mechanism that has been widely reported as a mode of action of statins. One example related to the stabilization effect of statins is that statins inhibit MMP-2 and MMP-9 secretion through the suppression of RhoA activation and Rab prenylation, respectively[55, 56]. Statins inhibit the isoprenylation of small G-proteins by inhibiting the synthesis

A



B

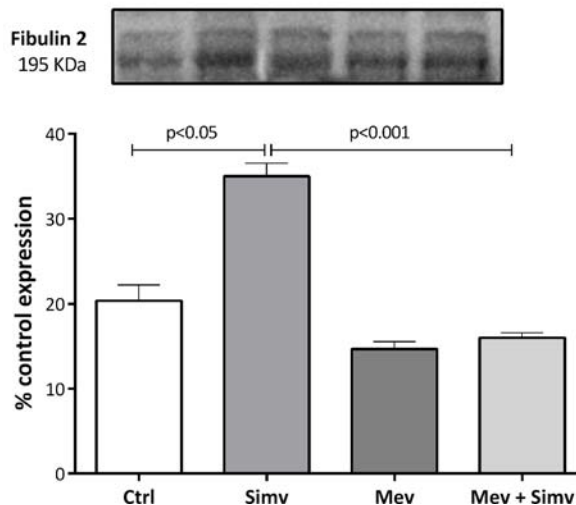


Fig 3. Effect of simvastatin and mevalonate in secreted fibulin 2 expression in culture medium from human coronary artery SMCs. Cells were preincubated for 2 hours with mevalonate (200 μ M) and treated with simvastatin for 24 hours. Blot bands were normalized to actin and quantified with Quantity One Analysis Software version 4.6.2. A representative Western blot is shown. The results are shown as the mean with the standard error of the mean (SEM) for four independent experiments in 3A (1 with cell lot number 4C1284 and 3 with cell lot number 886619) and three independent experiments in 2B with cell lot number 886619. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction.

doi:10.1371/journal.pone.0133875.g003

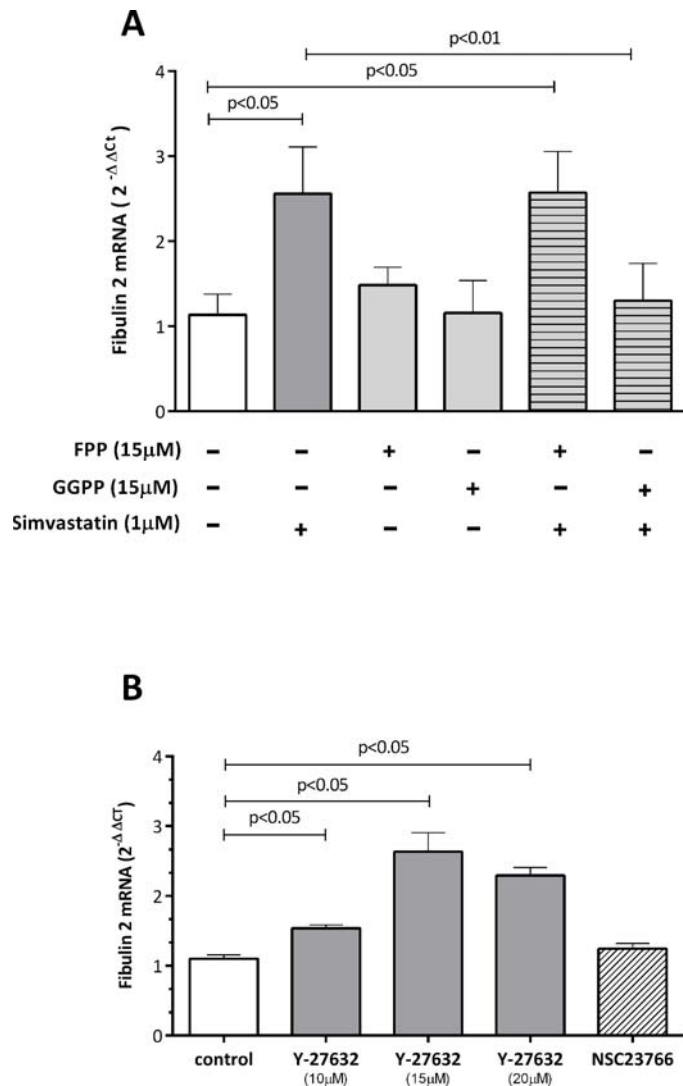


Fig 4. Effect of GGPP and FPP (A) and the ROCK inhibitor Y-27632 and Rac inhibitor NCS23766 (B) on simvastatin-induced fibulin-2 mRNA levels in human coronary artery SMCs. Cells were incubated with simvastatin and isoprenoids or with the inhibitors for 24 hours. The results are shown as the mean with the standard error of the mean (SEM) for twelve independent experiments in both A and B (2 with cell lot number 4C0915, 4 with cell lot number 4C1284, and 6 with cell lot number 886619). Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction. FPP: farnesyl pyrophosphate, GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate.

doi:10.1371/journal.pone.0133875.g004

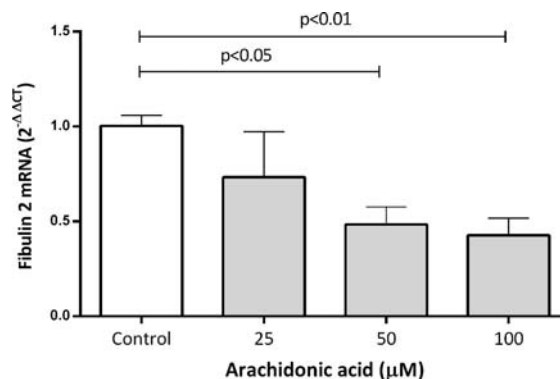


Fig 5. Effect of AA on fibulin-2 mRNA levels in human coronary artery SMCs. Cells were treated with AA for 24 hours. The results are shown as the mean with the standard error of the mean (SEM) for three independent experiments (2 with cell lot number 4C0915 and 1 with cell lot number 4C1284). Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction. AA: arachidonic acid.

doi:10.1371/journal.pone.0133875.g005

of important isoprenoids, which prevents the attachment of the small G-proteins to the cell membrane, thereby inhibiting their ability to transduce signals through MAPK pathways.

In conclusion, the simvastatin-induced upregulation of fibulin-2 expression may affect the composition and structure of the ECM. Whether this effect has a beneficial impact on atherosclerosis plaque characteristics needs further investigation.

Supporting Information

S1 Fig. Effect of simvastatin on fibulin-1, -2, -4 and -5 mRNA levels in human coronary artery SMCs. Cells were treated with simvastatin for 6 hours. The results are shown as the mean with standard error of the mean for three independent experiments. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction. (DOCX)

S2 Fig. Effect of mevalonate and simvastatin on fibulin-1, -4, and -5 mRNA levels in human coronary artery SMCs. Cells were pre incubated for 2 hours with mevalonate (100 μM) and treated with simvastatin (1 μM) for 24 hours. The results are shown as the mean with the standard deviation for at least three independent experiments. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction. (DOCX)

S3 Fig. Effect of FPP, GGPP, and simvastatin on fibulin-1, -4, and -5 mRNA levels in human coronary artery SMCs. Cells were incubated with simvastatin (1 μM) and isoprenoids (15 μM) for 24 hours. The results are shown as the mean with the standard deviation for at least three independent experiments. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction. FPP: farnesyl pyrophosphate, GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate, Simv: simvastatin. (DOCX)

S4 Fig. Effect of the ROCK inhibitor Y-27632 and Rac inhibitor NCS23766 on fibulin-1, -4, and -5 mRNA levels in human coronary artery SMCs. Cells were incubated with the

inhibitors for 24 hours. The results are shown as the mean with the standard deviation for at least three independent experiments. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction.
 (DOCX)

S5 Fig. Effect of fatty acids on fibulin-2 mRNA levels in human coronary artery SMCs.

Cells were treated with different concentrations of fatty acids for 24 hours. The results are shown as the mean with the standard deviation for three independent experiments. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction. PA: Palmitic acid, OA: oleic acid, LA: linoleic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid.
 (DOCX)

S1 Table. Effect of simvastatin on fibulin -1, -4, and -5 mRNA levels in human coronary artery SMCs.

Cells were treated with different concentrations simvastatin for 24 hours. The results are shown as the mean with standard deviation for three independent experiments. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction.
 (DOCX)

S2 Table. Effect of simvastatin on fibulin -1 and -5 protein levels in human coronary artery SMCs.

Cells were treated with different concentrations simvastatin for 24 hours. The results are shown as the mean with standard deviation for three independent experiments. Comparisons were performed using ANOVA followed by Dunnett post-test correction.
 (DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LM JCV. Performed the experiments: NS RR JCV. Analyzed the data: NS JCV. Contributed reagents/materials/analysis tools: NS RR. Wrote the paper: JCV LM.

References

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 129(3):399–410. doi: [10.1161/01.cir.0000442015.53336.12](https://doi.org/10.1161/01.cir.0000442015.53336.12) PMID: [24446411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24446411/).
2. Mackay J, Mensah G, editors. WHO: The Atlas of Heart Disease and Stroke 2004; Brighton BN1 1EJ.
3. Green J, Yurdagül A Jr., McInnis MC, Albert P, Orr AW. Flow patterns regulate hyperglycemia-induced subendothelial matrix remodeling during early atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2014; 232(2):277–84. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.052](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.052) PMID: [24468139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24468139/); PubMed Central PMCID: PMC3905249.
4. Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW, et al. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur Heart J*. 2004; 25(12):1077–82. doi: [10.1016/j.ehj.2004.01.002](https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.01.002) PMID: [15191780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15191780/).
5. ten Kate GL, Sijbrands EJ, Staub D, Coll B, ten Cate FJ, Feinstein SB, et al. Noninvasive imaging of the vulnerable atherosclerotic plaque. *Current problems in cardiology*. 2010; 35(11):556–91. doi: [10.1016/j.cpcardiol.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2010.09.002) PMID: [20974314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974314/).
6. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001; 104(16):1899–904. PMID: [11602491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11602491/).
7. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 1995; 92(6):1565–9. PMID: [7664441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7664441/).

8. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, et al. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011; 364(3):226–35. doi: [10.1056/NEJMoa1002358](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1002358) PMID: [21247313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21247313/).
9. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000; 83(3):361–6. PMID: [10677422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10677422/); PubMed Central PMCID: [PMC1729334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC1729334/).
10. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006; 47(8 Suppl):C7–12. doi: [10.1016/j.jacc.2005.09.068](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068) PMID: [16631513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16631513/).
11. Doyle B, Caplice N. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007; 49(21):2073–80. doi: [10.1016/j.jacc.2007.01.089](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.01.089) PMID: [17531655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17531655/).
12. Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *The Journal of pathology*. 1999; 188(2):189–96. doi: [10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199906\)188:2<189::AID-PATH336>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<189::AID-PATH336>3.0.CO;2-N) PMID: [10398163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10398163/).
13. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004; 110(14):2032–8. doi: [10.1161/01.CIR.0000143233.87854.23](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000143233.87854.23) PMID: [15451780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15451780/).
14. Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*. 2006; 113(18):2245–52. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955) PMID: [16684874](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16684874/).
15. Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM. Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO reports*. 2003; 4(12):1127–31. doi: [10.1038/sj.embor.7400033](https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400033) PMID: [14647206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14647206/); PubMed Central PMCID: [PMC1326425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC1326425/).
16. Chu ML, Tsuda T. Fibulins in development and heritable disease. *Birth defects research Part C, Embryo today: reviews*. 2004; 72(1):25–36. doi: [10.1002/bdrc.20003](https://doi.org/10.1002/bdrc.20003) PMID: [15054902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15054902/).
17. Longmate WM, Monichan R, Chu ML, Tsuda T, Mahoney MG, DiPersio CM. Reduced Fibulin-2 Contributes to Loss of Basement Membrane Integrity and Skin Blistering in Mice Lacking Integrin $\alpha 3$ - $\beta 1$ in the Epidermis. *The Journal of investigative dermatology*. 2014; 134(6):1609–17. doi: [10.1038/jid.2014.10](https://doi.org/10.1038/jid.2014.10) PMID: [24390135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24390135/); PubMed Central PMCID: [PMC4020984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4020984/).
18. Yanagisawa H, Davis EC. Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010; 42(7):1084–93. doi: [10.1016/j.biocel.2010.03.009](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.009) PMID: [20236620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20236620/); PubMed Central PMCID: [PMC2880191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2880191/).
19. Noda K, Dabovic B, Takagi K, Inoue T, Horiguchi M, Hirai M, et al. Latent TGF- β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110(8):2852–7. doi: [10.1073/pnas.1215791110](https://doi.org/10.1073/pnas.1215791110) PMID: [23382201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23382201/); PubMed Central PMCID: [PMC3581912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3581912/).
20. Sideek MA, Menz C, Parsi MK, Gibson MA. LTBP-2 competes with tropoelastin for binding to fibulin-5 and heparin, and is a negative modulator of elastinogenesis. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2014; 34:114–23. doi: [10.1016/j.matbio.2013.10.007](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.007) PMID: [24148803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24148803/).
21. Sicot FX, Tsuda T, Markova D, Klement JF, Arita M, Zhang RZ, et al. Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. *Molecular and cellular biology*. 2008; 28(3):1061–7. doi: [10.1128/MCB.01876-07](https://doi.org/10.1128/MCB.01876-07) PMID: [18070922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18070922/); PubMed Central PMCID: [PMC2223402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2223402/).
22. Laugesen E, Hoyem P, Christiansen JS, Knudsen ST, Hansen KW, Argraves WS, et al. Plasma levels of the arterial wall protein fibulin-1 are associated with carotid-femoral pulse wave velocity: a cross-sectional study. *Cardiovascular diabetology*. 2013; 12(1):107. doi: [10.1186/1475-2840-12-107](https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-107) PMID: [23866070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23866070/); PubMed Central PMCID: [PMC3722025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3722025/).
23. Scholze A, Bladbjerg EM, Sidelmann JJ, Diederichsen AC, Mickley H, Nybo M, et al. Plasma concentrations of extracellular matrix protein fibulin-1 are related to cardiovascular risk markers in chronic kidney disease and diabetes. *Cardiovascular diabetology*. 2013; 12:6. doi: [10.1186/1475-2840-12-6](https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-6) PMID: [23294625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23294625/); PubMed Central PMCID: [PMC3570481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3570481/).
24. Sawyer SL, Dicke F, Kirton A, Rajapakse T, Rebeyka IM, McInnes B, et al. Longer term survival of a child with autosomal recessive cutis laxa due to a mutation in FBLN4. *American journal of medical genetics Part A*. 2013; 161A(5):1148–53. doi: [10.1002/ajmg.a.35827](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35827) PMID: [23532871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23532871/).
25. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *The New England journal of medicine*. 2012; 367(15):1417–27. doi: [10.1056/NEJMoa1115050](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1115050) PMID: [23050525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23050525/); PubMed Central PMCID: [PMC3761217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3761217/).
26. Hu B, Nandhu MS, Sim H, Agudelo-Garcia PA, Saldivar JC, Dolan CE, et al. Fibulin-3 promotes glioma growth and resistance through a novel paracrine regulation of Notch signaling. *Cancer research*. 2012;

- 72(15):3873–85. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-12-1060](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1060) PMID: [22665268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665268/); PubMed Central PMCID: PMC3896095.
27. Stone EM, Braun TA, Russell SR, Kuehn MH, Lotery AJ, Moore PA, et al. Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2004; 351(4):346–53. doi: [10.1056/NEJMoa040833](https://doi.org/10.1056/NEJMoa040833) PMID: [15269314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15269314/).
28. Strom A, Olin AI, Aspberg A, Hultgardh-Nilsson A. Fibulin-2 is present in murine vascular lesions and is important for smooth muscle cell migration. *Cardiovascular research*. 2006; 69(3):755–63. doi: [10.1016/j.cardiores.2005.12.001](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.001) PMID: [16409997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16409997/).
29. Babelova A, Sedding DG, Brandes RP. Anti-atherosclerotic mechanisms of statin therapy. *Current opinion in pharmacology*. 2013; 13(2):260–4. doi: [10.1016/j.coph.2013.01.004](https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.01.004) PMID: [23402735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23402735/).
30. Birnbaum Y, Ye Y. Pleiotropic effects of statins: the role of eicosanoid production. *Current atherosclerosis reports*. 2012; 14(2):135–9. doi: [10.1007/s11883-012-0232-5](https://doi.org/10.1007/s11883-012-0232-5) PMID: [22286195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22286195/).
31. Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends in molecular medicine*. 2008; 14(1):37–44. doi: [10.1016/j.molmed.2007.11.004](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.11.004) PMID: [18068482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18068482/); PubMed Central PMCID: PMC2621332.
32. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American journal of cardiology*. 2003; 91(4A):4B–8B. PMID: [12615292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12615292/).
33. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *The New England journal of medicine*. 2013; 368(21):2004–13. doi: [10.1056/NEJMra1216063](https://doi.org/10.1056/NEJMra1216063) PMID: [23697515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23697515/).
34. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, et al. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*. 2001; 103(7):993–9. PMID: [11181475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11181475/).
35. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2004; 291(9):1071–80. doi: [10.1001/jama.291.9.1071](https://doi.org/10.1001/jama.291.9.1071) PMID: [14996776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14996776/).
36. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001; 103(7):926–33. PMID: [11181465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11181465/).
37. Nakamura T, Obata JE, Kitta Y, Takano H, Kobayashi T, Fujioka D, et al. Rapid stabilization of vulnerable carotid plaque within 1 month of pitavastatin treatment in patients with acute coronary syndrome. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2008; 51(4):365–71. doi: [10.1097/FJC.0b013e318165dca4](https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318165dca4) PMID: [18427279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18427279/).
38. Takarada S, Imanishi T, Kubo T, Tanimoto T, Kitabata H, Nakamura N, et al. Effect of statin therapy on coronary fibrous-cap thickness in patients with acute coronary syndrome: assessment by optical coherence tomography study. *Atherosclerosis*. 2009; 202(2):491–7. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.014](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.014) PMID: [18572175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18572175/).
39. Hattori K, Ozaki Y, Ismail TF, Okumura M, Naruse H, Kan S, et al. Impact of statin therapy on plaque characteristics as assessed by serial OCT, grayscale and integrated backscatter-IVUS. *JACC Cardiovascular imaging*. 2012; 5(2):169–77. doi: [10.1016/j.jcmg.2011.11.012](https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2011.11.012) PMID: [22340823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22340823/).
40. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 2004; 109(23 Suppl 1):III39–43. doi: [10.1161/01.CIR.0000131517.20177.5a](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131517.20177.5a) PMID: [15198965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15198965/).
41. Ruperez M, Rodriguez-Diez R, Blanco-Colio LM, Sanchez-Lopez E, Rodriguez-Vita J, Esteban V, et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. *Hypertension*. 2007; 50(2):377–83. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.091264](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.091264) PMID: [17592071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17592071/).
42. Garcia MC, Williams J, Johnson K, Olden K, Roberts JD. Arachidonic acid stimulates formation of a novel complex containing nucleolin and RhoA. *FEBS letters*. 2011; 585(4):618–22. doi: [10.1016/j.febslet.2011.01.035](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.035) PMID: [21281639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21281639/); PubMed Central PMCID: PMC3089762.
43. Brown M, Roulson JA, Hart CA, Tawadros T, Clarke NW. Arachidonic acid induction of Rho-mediated transendothelial migration in prostate cancer. *British journal of cancer*. 2014; 110(8):2099–108. doi: [10.1038/bjc.2014.99](https://doi.org/10.1038/bjc.2014.99) PMID: [24595005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24595005/); PubMed Central PMCID: PMC3992515.
44. Wu X, Shang A, Jiang H, Ginsberg HN. Demonstration of biphasic effects of docosahexaenoic acid on apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997; 17(11):3347–55. PMID: [9409332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9409332/).
45. Sasaki T, Gohring W, Pan TC, Chu ML, Timpl R. Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *Journal of molecular biology*. 1995; 254(5):892–9. doi: [10.1006/jmbi.1995.0664](https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0664) PMID: [7500359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7500359/).

46. Olin AJ, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D, Aspberg A. The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276(2):1253–61. doi: [10.1074/jbc.M006783200](https://doi.org/10.1074/jbc.M006783200) PMID: [11038354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11038354/).
47. Utani A, Nomizu M, Yamada Y. Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272(5):2814–20. PMID: [9006922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9006922/).
48. Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu ML, Gohring W, et al. Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271(32):19489–96. PMID: [8702639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8702639/).
49. Gu YC, Nilsson K, Eng H, Ekblom M. Association of extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 with fibronectin in bone marrow stroma. *British journal of haematology*. 2000; 109(2):305–13. PMID: [10848816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10848816/).
50. Sasaki T, Wiedemann H, Matzner M, Chu ML, Timpl R. Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix. *Journal of cell science*. 1996; 109 (Pt 12):2895–904. PMID: [9013337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9013337/).
51. Yi CH, Smith DJ, West WW, Hollingsworth MA. Loss of fibulin-2 expression is associated with breast cancer progression. *The American journal of pathology*. 2007; 170(5):1535–45. doi: [10.2353/ajpath.2007.060478](https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060478) PMID: [17456760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456760/); PubMed Central PMCID: PMC1854949.
52. Papke CL, Yanagisawa H. Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2014. doi: [10.1016/j.matbio.2014.02.004](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.02.004) PMID: [24613575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24613575/).
53. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007; 170(6):1807–16. doi: [10.2353/ajpath.2007.070112](https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112) PMID: [17525249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17525249/); PubMed Central PMCID: PMC1899462.
54. Vallve JC, Serra N, Zalba G, Fortuno A, Belouqui O, Ferre R, et al. Two variants in the fibulin2 gene are associated with lower systolic blood pressure and decreased risk of hypertension. *PloS one*. 2012; 7(8):e43051. doi: [10.1371/journal.pone.0043051](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043051) PMID: [22912785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22912785/); PubMed Central PMCID: PMC3418224.
55. Li M, Li Z, Sun X. Statins suppress MMP2 secretion via inactivation of RhoA/ROCK pathway in pulmonary vascular smooth muscles cells. *European journal of pharmacology*. 2008; 591(1–3):219–23. doi: [10.1016/j.ejphar.2008.06.082](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.082) PMID: [18619957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18619957/).
56. Bellostta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998; 18(11):1671–8. PMID: [9812903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9812903/).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

Supporting Information

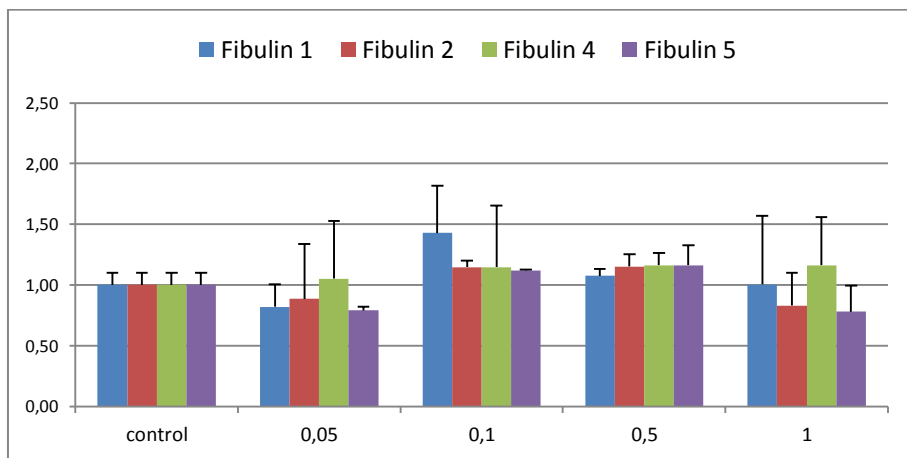


Figura S1.

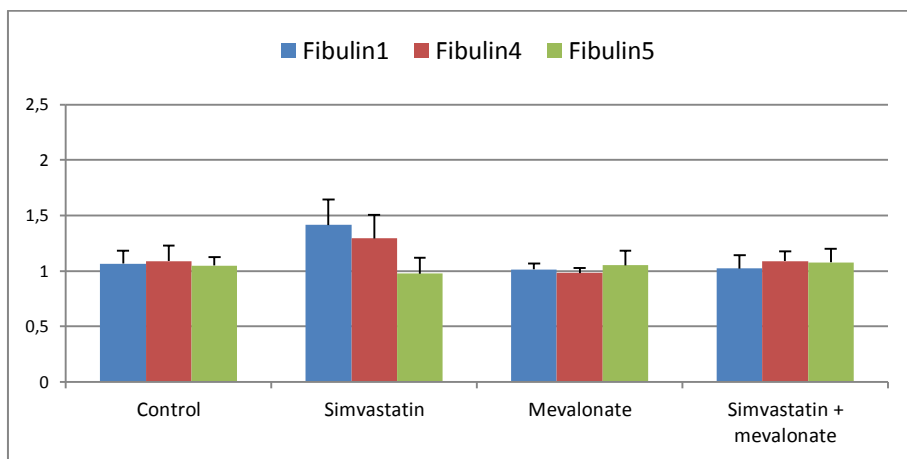


Figura S2.

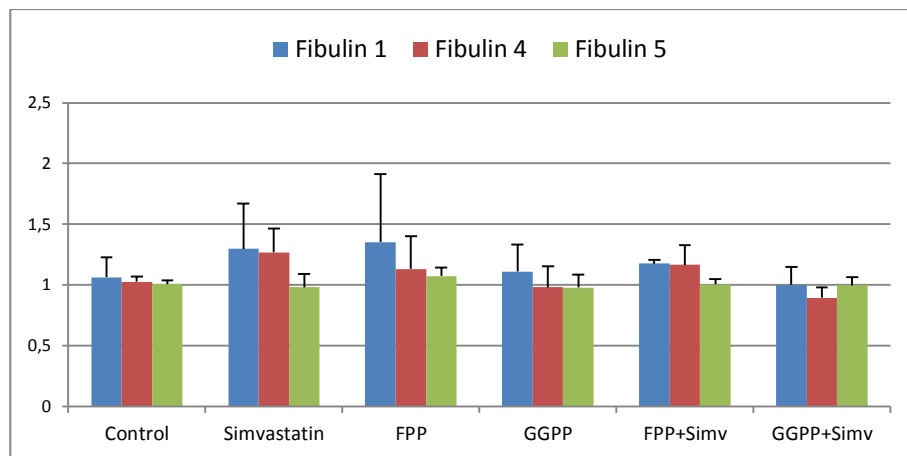


Figura S3.

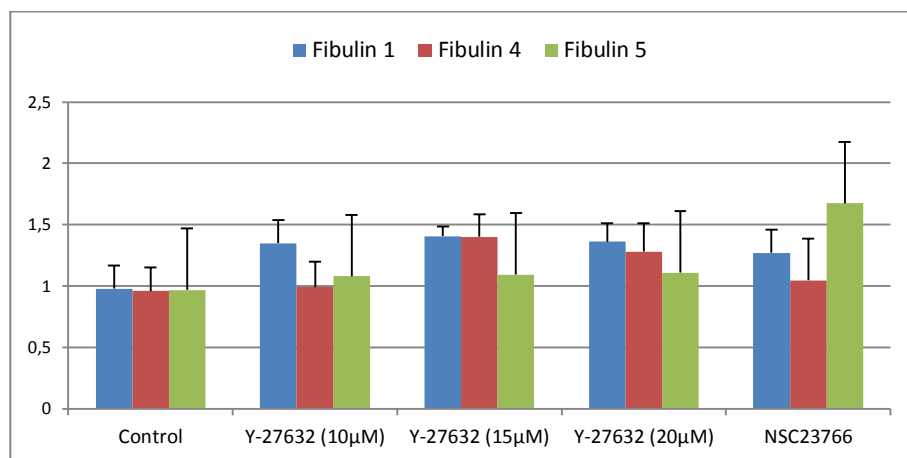


Figura S4.

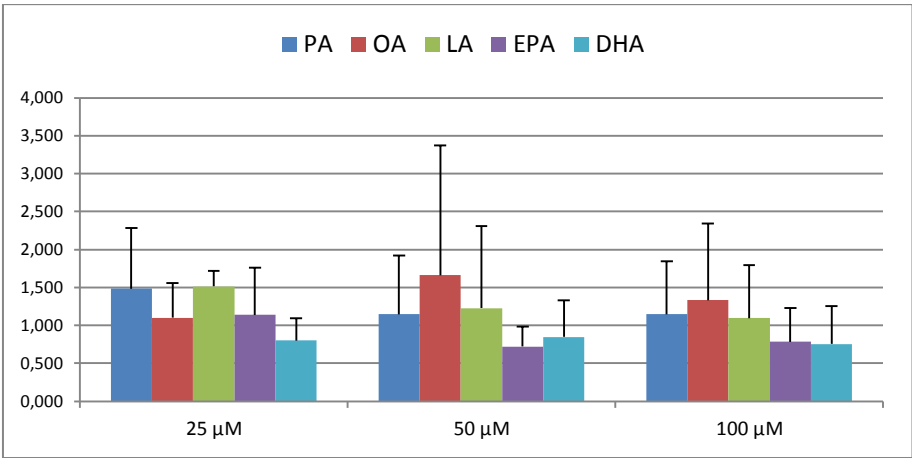


Figura S5.

		Fibulin-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)		Fibulin-4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)		Fibulin-5 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
Simvastatin	control	1		1		1	
	0.05 μM	0,81	0,09	1,31	0,00	0,87	0,17
	0.1 μM	0,81	0,13	1,32	0,07	1,21	0,13
	0.5 μM	0,87	0,39	1,39	0,33	0,92	0,01
	1 μM	0,74	0,08	0,92	0,05	0,91	0,18

Taula S1.

		Fibulin-1 Fold increase				Fibulin-5 Fold increase	
		mean	SD			mean	SD
Simvastatin	control	1	0,06	control	1	0,06	
	0.1 μ M	1,07	0,08	Simvastatin	0.5 μ M	0,8	0,29
	0.5 μ M	1,04	0.13		1 μ M	1,2	0,59
	1 μ M	1,04	0.07				

Taula S2.

3. RESULTATS ADDICIONALS

3.1. Estudi d'associació dels gens de la FBLN1 i FBLN5 amb la pressió arterial

3.1.1. Freqüències genotípiques i al·lèliques de FBLN1 i FBLN5.

En l'anàlisi dels SNPs del gen de la FBLN 1 s'observa que no hi ha diferències significatives en les freqüències genotípiques i al·lèliques dels pacients hipertensos respecte els control en el rs9682 i en el cas del rs7510719 cap individu presenta aquest SNP. Tampoc s'observen diferències significatives en els SNPs de FBLN5 escollits.

FBLN1

SNP		AA	Aa	aa	MAF	Allele Freq.	Genot. Freq.
		nombre (percentatge)			%	P valor	
FBLN1-e9 rs9682		CC	CT	TT	T	0,07	
	controls	109(32,6)	182(54,5)	43(12,9)	0,4		
	HTA	151(34,6)	207(47,4)	79(18,1)	0,4		
		GG					
FBLN1-e41 rs7510719	Controls	334(100)			0		
	HTA	439(100)			0		

FBLN5

SNP		AA	Aa	aa	MAF	Allele Freq.	Genot. Freq.
		nombre (percentatge)		%		P valor	
		AA	AG	GG	G		
FBLN5-p rs2474030	controls	82(24,9)	171(52)	76(23,1)	0,49	0,79	0,9
	HTA	110(25)	234(53,2)	96(21,8)	0,48		
		GG	AG	AA	A		
FBLN5-i41 rs2430363	Controls	92(27,5)	172(51,5)	70(21)	0,47	0,5	0,36
	HTA	139(31,7)	205(46,7)	95(21,6)	0,45		
		TT	CT	CC	C		
FBLN5-i42 rs2284340	controls	138(41,7)	142(42,9)	51(15,4)	0,37	0,36	0,16
	HTA	182(41,7)	206(47,2)	48(11)	0,35		
		CC	CT	TT	T		
FBLN5-e9 rs2430347	Controls	177(53)	124(37,1)	33(9,9)	0,28	0,23	0,17
	HTA	238(54,7)	170(39,1)	27(6,2)	0,26		
		CC	CT	TT	T		
FBLN5-i10 rs2267989	controls	104(31,1)	169(50,6)	61(18,3)	0,44	0,35	0,55
	HTA	153(34,9)	210(47,8)	76(17,3)	0,41		

3.1.2. Associació dels SNPs de les fibulines-1 i -5 amb PAS, PAD, HTA i IMT

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de la variància (ANOVA) no presenten associació de cap dels SNPs estudiats amb les variables relacionades amb la pressió arterial ni amb la mitjana de la IMT de les caròtides dreta i esquerra.

FBLN1

SNP	P valor	
FBLN1-e9 rs9682	PAS	0,219
	PAD	0,192
	HTA	0,457
	IMT	0,723

FBLN5

SNP	P valor	
FBLN5-p rs2474030	PAS	0,710
	PAD	0,674
	HTA	0,347
	IMT	0,700

FBLN 5-i41 rs2430363	PAS	0,534
	PAD	0,495
	HTA	0,460
	IMT	0,825

FBLN5-i42 rs2284340	PAS	0,361
	PAD	0,694
	HTA	0,198
	IMT	0,087

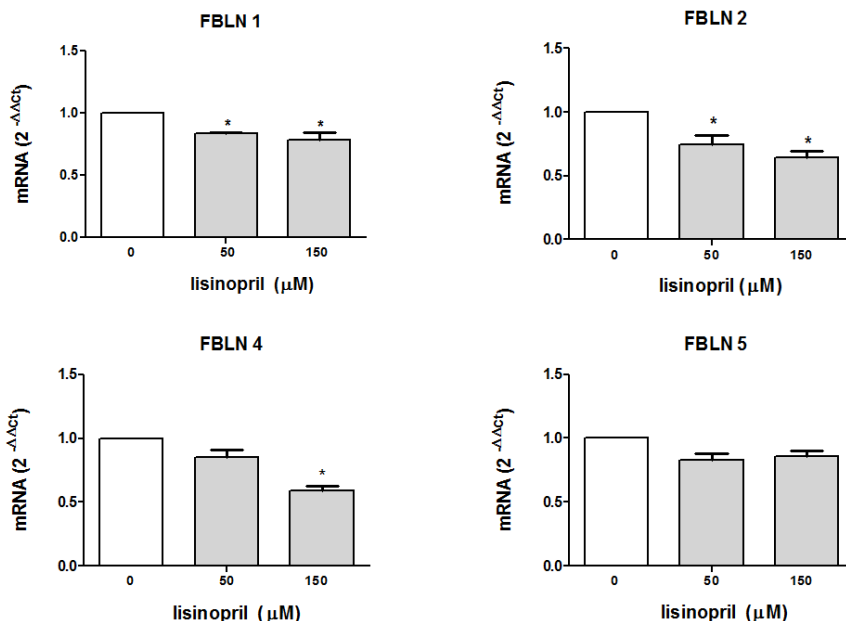
FBLN5-e9 rs2430347	PAS	0,988
	PAD	0,533
	HTA	0,773
	IMT	0,956

FBLN5-i10 rs2267989	PAS	0,450
	PAD	0,959
	HTA	0,231
	IMT	0,802

3.2. Efectes *in vitro* de fàrmacs hipotensors (lisinopril i amlodipina) sobre l'expressió gènica i proteica de les fibulines-1, -2, -4 i -5

3.2.1. Efecte del lisinopril sobre l'expressió gènica de les fibulines-1, -2, -4 i -5

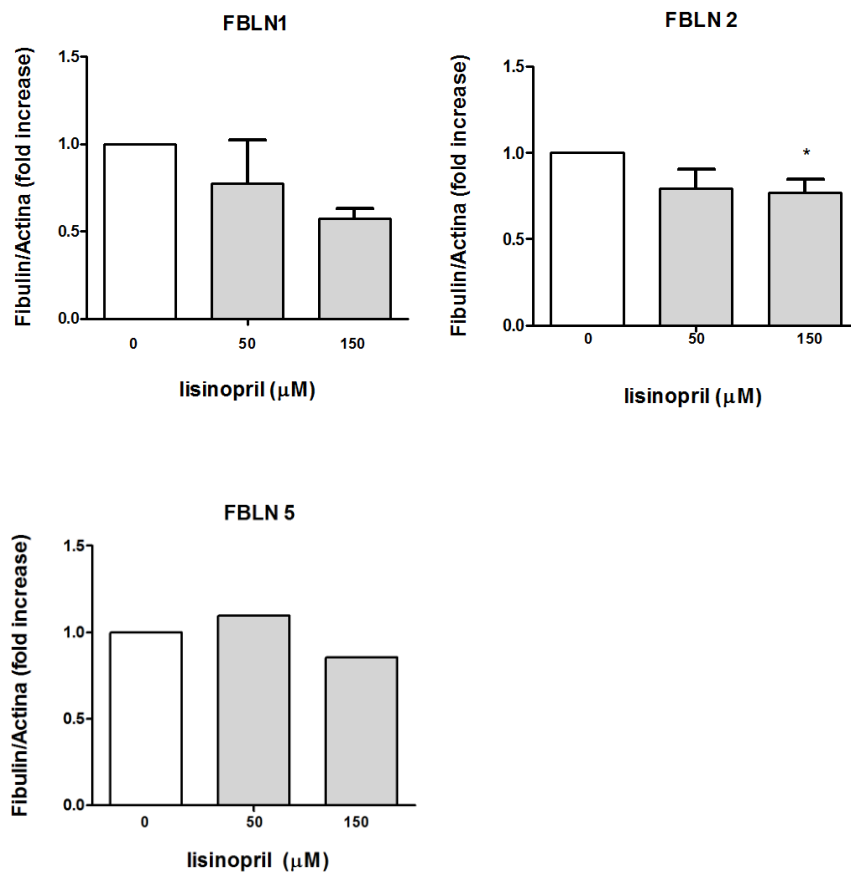
24 hores després del tractament amb lisinopril s'observa que l'expressió gènica de les fibulines-1, -2 i -4 disminueix de forma dosi-depenent en HCASMC si ho comparem amb els controls. Els resultats obtinguts mostren una disminució a la concentració de 50 μ M d'un 17%, 26% i 15% i a la concentració 150 μ M d'un 22%, 36% i 42% respectivament. D'altra banda no vam observar cap efecte sobre l'expressió de fibulina-5 a les concentracions estudiades.



Representació gràfica dels resultats obtinguts sobre l'expressió gènica de les fibulines-1, -2 i -4 a partir de l'incubació durant 24h de diferents dosis de lisinopril. Els resultats representen la mitjana de quatre experiments fets per duplicat. *p<0.05 vs control

3.2.2. Efecte del lisinopril sobre l'expressió proteica de les fibulines -1, -2, -4 i -5

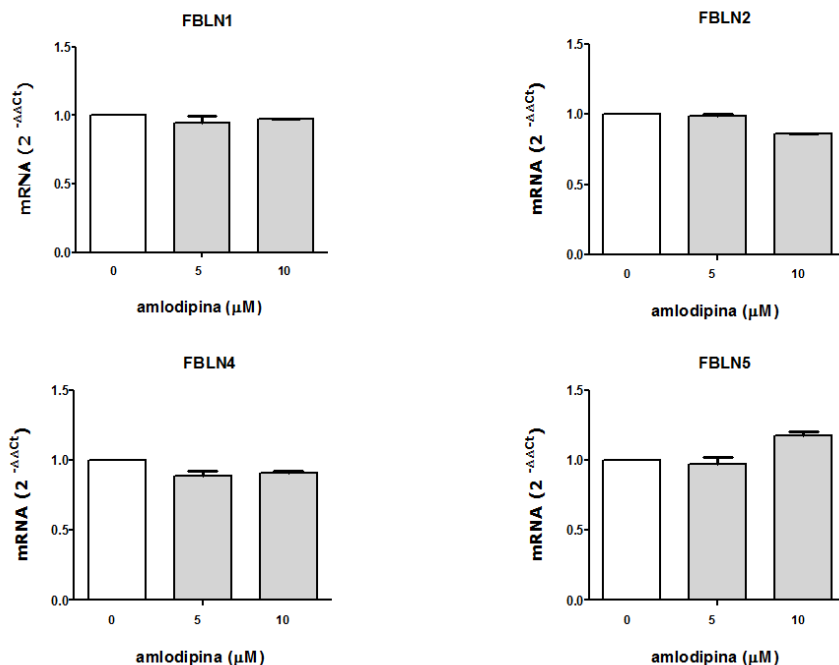
Mitjançant l'anàlisi per *western blot* s'observa que a nivell proteic la fibulina-1 i la -2 presenten una tendència a disminuir la seva expressió, a 50 μM d'un 23% i 21% i a 150 μM del 43% i 24 % respectivament. En aquest cas també s'observa que l'expressió proteica de la fibulina-5 no mostra cap canvi a les concentracions de lisinopril emprades.



Efecte sobre l'expressió proteica de les fibulines-1, -2 i -5, a partir de l'incubació de HCASMCs amb lisinopril a concentracions creixents (50-150 μM) durant 24h. Els resultats representen la mitjana de tres experiments fets per duplicat. *p<0.05 vs control

3.2.3. Efecte de l'amlodipina sobre l'expressió gènica de les fibulines-1, -2, -4 i -5

En els resultats obtinguts en l'expressió de les HCASMC incubades amb les concentracions d'amlodipina 5 i 10 μM durant 24h, podem observar que no es produeix canvis en els nivells de mRNA de les fibulines estudiades, a les concentracions escollides.

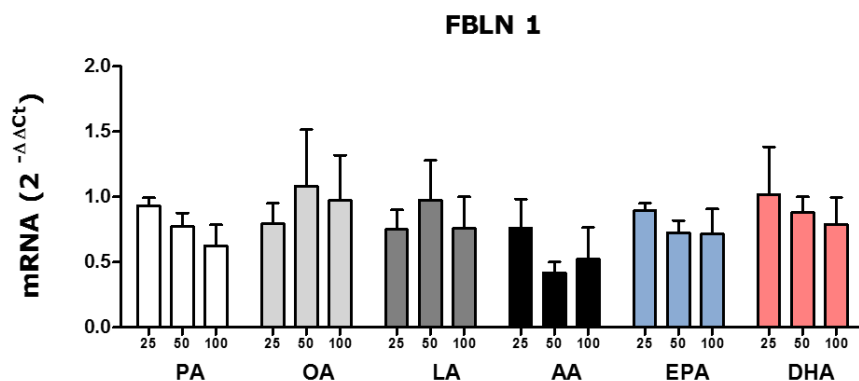


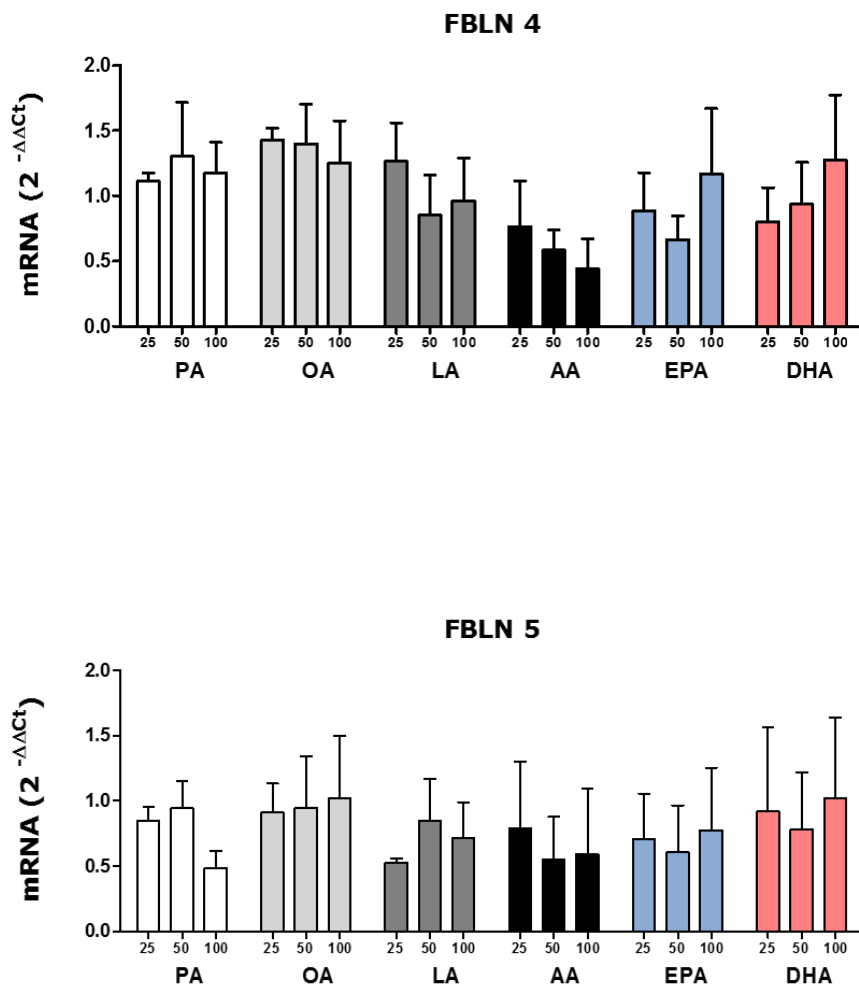
Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'incubació amb amlodipina 5 i 10 μM durant 24h.

3.3. Efecte in vitro dels àcids grassos sobre l'expressió gènica i proteica de les fibulines-1, -2, -4 i -5

3.3.1. Efecte dels àcids grassos sobre l'expressió gènica de les fibulines-1, -4 i -5

Després d'incubar durant 24h les HCASMC a les concentracions de 25, 50 i 100 μ M amb els diferents àcids grassos escollits (palmític (PA), oleic (AO), linoleic (LA), araquidònic (AA), eicosapentanoic (EPA) i docosahexanoic (DHA)), no s'han trobat diferències significatives en les expressions gèniques de les fibulines-1, -4 i -5.

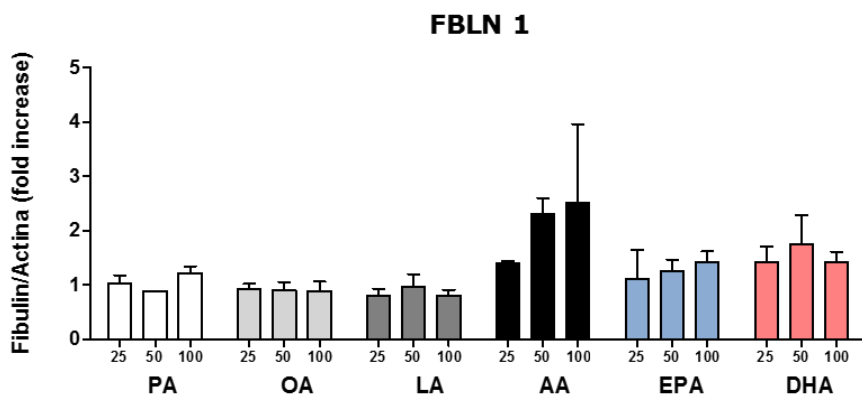


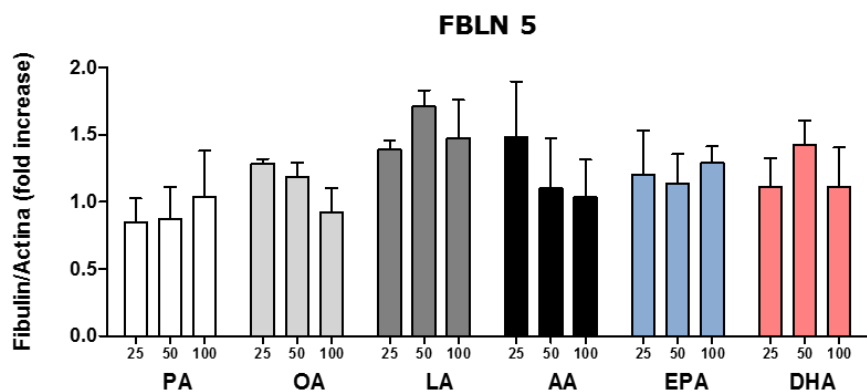
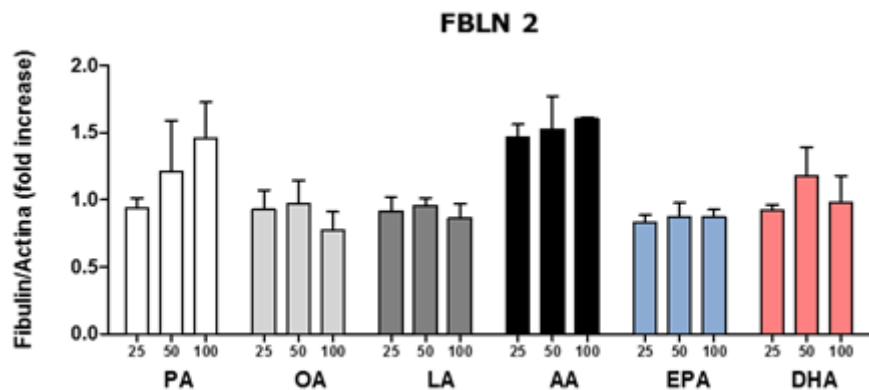


Representació gràfica dels nivells de mRNA de les fibulines-1, -4 i -5 a partir de l'incubació amb PA, OA, LA, AA, EPA i DHA a 25, 50 i 100 μM durant 24h. Els resultats representen la mitjana de tres experiments fets per duplicat.

3.3.2. Efecte dels àcids grassos sobre l'expressió proteica de les fibulines-1, -2 i -5

Mitjançant l'anàlisi per *western blot* no s'observa cap efecte dels àcids grassos PA, OA, LA, AA, EPA i EPA sobre l'expressió proteica de les fibulines -1, -2 i -5 en HCASMC a les 24h d'ncubació i a les concentracions estudiades.





Representació gràfica de l'expressió proteica de les fibulines-1, -2 i -5 a partir de l'incubació amb PA, OA, LA, AA, EPA i DHA a 25, 50 i 100 μM durant 24h. Els resultats representen la mitjana de tres experiments fets per duplicat. *p<0.05 vs control

4. RESUM DE RESULTATS

4.1. Two variants in the fibulin 2 gene are associated with lower systolic blood pressure and decreased risk of hypertension.

En l'estudi d'associació de gens candidats s'observa que dels quatre SNPs escollits n'hi ha dos (rs3732666 (exò2) i rs1061376 (exò18)) que presenten una associació amb la HTA.

4.1.1 Freqüències al·lèliques i genotípiques

Els pacients hipertensos presenten una freqüència de l'al·lel menor (G) del rs3732666 significativament més baixa comparat amb el grup control (0,19 vs 0,24; $p=0,024$) de manera que constitueix un al·lel protector. La odds ratio (OR) de hipertensos per aquest al·lel és de 0,75 ($p=0,022$).

Pel que fa a les freqüències genotípiques, l'agrupació dels genotips portadors de l'al·lel G (GG i AG) mostren una freqüència menor en hipertensos que en controls ($p=0,022$).

D'altra banda, pel cas del rs1061376 les freqüències al·lèliques no són diferents, a diferència de les genotípiques que mostren una disminució significativa del genotip 'TT' en el grup d'hipertensos (7,7%) comparat amb els controls (13,8%), $p=0,024$. De manera que T també és protector davant la HTA.

4.1.2. Associació de rs3732666 (exò2) amb PAS, PAD i HTA

El coeficient β de la regressió lineal del model corregit per factors de confusió i interaccions de primer grau, mostra que els portadors de l'al·lel G (AG+GG) respecte als homozigots AA presenten valors significativament menors de PAS (-3,6; $p=0,048$). Aquest efecte presenta una interacció significativa del rs3732666 amb l'edat ($p=0,003$). S'observa que l'efecte de ser portador de l'al·lel G sobre la PAS disminueix amb l'edat. Si analitzem per franges d'edat l'efecte és significatiu en els grups més joves, de manera que als 35 i 45 anys els valors de β són -6,83 i -5,94 mmHg ($p=0,026$ i $p=0,009$) respectivament. Aquest efecte es perd en incrementar l'edat, ja que als 55 i 65 anys els valors són de -3,37 i 0,15 mmHg respectivament. A més s'observa que els portadors de l'al·lel G tenen una disminució significativa de les odds ratio de HTA (0,71; $p=0,021$). En aquest cas observem una interacció significativa del SNP amb l'edat ($p=0,02$). Aquest SNP no presenta cap associació significativa amb la PAD.

4.1.3. Associació de rs1061376 (exò18) amb PAS, PAD i HTA

El coeficient β de la regressió lineal del model corregit per factors de confusió i interaccions de primer grau, mostra que els homozigots TT respecte als homozigots CC presenten valors significativament menors de PAS (-7,91; $p=0,008$) i de PAD (-3,69; $p=0,015$). No s'observa efectes significatius pels heterozigots CT. A més s'observa que els homozigots TT tenen una disminució significativa de la OR per la HTA

(0,47; $p=0,008$) si es comparen amb els homozigots CC. Els heterozigots CT no presenten efectes significatius.

4.1.4. Associació de rs3732666 i rs1061376 amb IMT

Pel rs3732666, l'anàlisi per regressió lineal múltiple ens indica que la presència de l'al·lel G és un predictor independent de IMT en la caròtida dreta (0,0037; $p=0,027$). Tot i no ser significativa també s'observa una disminució de la IMT en la caròtida esquerra dels portadors de l'al·lel G. Pel rs1061376, tot i no ser significatiu, els valors de IMT en la caròtida dreta i l'esquerra dels homozigots TT eren menors si els comparem amb els homozigots CC.

4.2. Simvastatin increases fibulin-2 expression in human coronary artery smooth muscle cells via rhoa/rho-kinase signaling pathway inhibition.

En aquest estudi s'observa un augment dels nivells gènics i proteics de la fibulina-2 en HCASMC incubades amb simvastatina produïts per la inhibició de la via RhoA/ROCK.

4.2.1. Efecte de la simvastatina sobre l'expressió de fibulina-2

24 hores després del tractament amb concentracions creixents de simvastatina s'observa que l'expressió gènica de la fibulina-2 augmenta significativament en HCASMC. Els resultats obtinguts mostren un

augment dels nivells de mRNA respecte al control de 1,7 vegades a la concentració de 0,1 μM i de 2,9 a la concentració 1 μM . Aquest efecte en l'expressió gènica també s'observa a nivell proteic. Els resultats mitjançant *western blot* i normalitzats per actina mostren un augment de l'expressió de fibulina-2 de 2,1 vegades a la concentració de 1 μM . A més, la preincubació de les cèl·lules amb mevalonat (200 μM) reverteix completament i de forma significativa l'efecte de la simvastatina tant a nivell gènica com a nivell proteic de manera que la ruta de la síntesi de colesterol està implicada en l'efecte de la simvastatina. Aquests efectes de la simvastatina i del mevalonat a nivell de fibulina-2 intracel·lular es corroboren a nivell de fibulina-2 extracel·lular, de manera que la simvastatina augmenta els nivells de fibulina-2 secretada i el mevalonat en reverteix l'efecte totalment.

També observem com el GGPP (15 μM), però no el FPP (15 μM), reverteix significativament l'efecte de la simvastatina sobre l'expressió gènica de fibulina-2. Aquests resultats ens indiquen que la via dels isoprenoides, concretament la via del GGPP, és la responsable dels canvis d'expressió de fibulina-2 induïts per la simvastatina. Com GGPP és el responsable de l'activació post-translacional de la GTPasa RhoA, la disminució de GGPP induïda pel tractament amb simvastatina està relacionada amb la inhibició de RhoA i en conseqüència afecta ROCK. Així doncs, s'observa que la inhibició és específica de ROCK, el tractament amb un inhibidor específic de ROCK (Y-27632) a les concentracions de 10, 15 i 20 μM presenta un increment dels nivells de

mRNA de fibulina-2 de 1.5, 2.6 i 2.3 respectivament, mentre el tractament amb un inhibidor de Rac-1 (NCS23766) no afecta.

D'altra banda demostrem que la activació de la via RhoA/ROCK per AA disminueix l'expressió de fibulina-2 mentre altres àcids grassos (PA, OA, LA, EPA i DHA) que no indueixen la via, no tenen efecte sobre l'expressió de fibulina-2.

VII. DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

La HTA és un problema de salut comú que afecta el 25% de la població adulta en les societats industrialitzades i és el major factor de risc d'infart de miocardi i accident cardiovascular^[191]. És un trastorn cardiovascular caracteritzat per una alteració del to vascular on el remodelatge vascular hi juga un paper molt important. Aquest remodelatge està associat a canvis bioquímics i fisiològics caracteritzats per un excés de contracció, creixement i proliferació de les CML^[191] i diferents graus d'inflamació en la paret arterial.

La proliferació i migració de les CML des de la media cap a l'íntima i la inflamació de la paret participen en una varietat de trastorns vasculars i contribueixen a la progressió de malalties com l'arteriosclerosi.

En la remodelació arterial el paper de la MEC és fonamental. Els canvis que es produeixen en la qualitat i quantitat dels seus components expliquen les alteracions en l'estructura i funció de la MEC en la HTA^[74]. Alguns d'aquests components que formen la MEC són glicoproteïnes, on trobem entre les més abundants molècules com les laminines, fibronectina i elastina, però d'altra banda altres grups de proteïnes de menor tamany que actuen modulant el comportament cel·lular i diverses funcions^[217]. Un d'aquest grup de proteïnes són les fibulines.

Les fibulines són una família de vuit glicoproteïnes associades amb les membranes basals i fibres elàstiques^[44, 98-100]. Les associacions d'aquestes proteïnes amb les estructures de la matriu es deuen a la capacitat que

tenen les fibulines per interaccionar amb una gran varietat dels constituents de la MEC. Les fibulines a més de formar ponts intermoleculars dins de la matriu extracel·lular també actuen com a mediadors de processos cel·lulars i en la remodelació de teixit^[18, 45, 128]. Les fibulines tot i compartir moltes similituds en la seva estructura bioquímica i localització, tenen funcions diferenciades, com la unió a diferents proteïnes. Les fibulines-1, -2, -4 i -5 tenen papers importants en diverses malalties cardiovasculars, tan en condicions normals com en condicions patològiques, particularment en aquelles que presenten canvis en l'aspecte mecànic tant en grans vasos com en el cor però el seu paper molecular no s'ha descrit encara amb detall^[29].

Així doncs, donat el paper de les fibulines com a molècules estructuradores de la MEC de la paret arterial, ens vam plantejar si aquestes proteïnes podrien estar implicades en la fisiologia de la HTA. Per comprovar aquesta hipòtesi es van dissenyar, per un costat estudis genètics d'associació primer entre FBLN2 i HTA i després entre FBLN5 i FBLN1 i HTA i d'altra banda estudis *in vitro* per valorar el paper sobre l'expressió de les fibulines de fàrmacs (antihipertensius i antihipercolesterolèmics) amb efectes descrits sobre la paret vascular.

En l'estudi d'associació de la FBLN2 (Objectiu 1) amb la HTA demostrem que variacions en el gen de la FBLN2 (rs3732666 i rs10061376) estan associats a menor PAS i menor risc de patir HTA. Aquests dos trets estan ben establerts com a factors de risc en malalties cardiovasculars. Els resultats pel rs3732666 presenten una associació dels

portadors de l'al·lel protector amb menor PAS. L'anàlisi de les dades indiquen una interacció significativa del rs3237666 amb l'edat. S'observa que l'efecte de ser portador de l'al·lel G sobre la PAS disminueix amb l'edat. Aquesta disminució podria ser causada per la diferència d'expressió que presenten les fibulines durant el desenvolupament, l'edat adulta i condicions patològiques. La fibulina-2 està molt expressada durant el procés de desenvolupament i succeeix el mateix quan es produeix algun dany en una gran varietat de teixits^[117], en canvi, en condicions fisiològiques normals la seva expressió es manté a nivells més baixos. També hem demostrat que la presència de l'al·lel G (rs3732666) és un predictor significatiu de IMT en la arteria caròtida (AC) dreta i està associat en diferents graus amb una menor IMT en la AC. D'altra banda pel rs1061376 les dades mostren un efecte recessiu on les dues còpies de l'al·lel menor són necessàries per tenir efecte sobre la pressió sanguínia.

En el segon estudi (objectius 2 i 3) hem demostrat que en HCASMC, 24 h de tractament amb simvastatina augmenta l'expressió de fibulina-2 intracel·lular i secretada tant a nivell gènic com a nivell proteic. A més, hem demostrat que el mecanisme involucrat és una disminució en les cèl·lules del mevalonat i de l'isoprenoide GGPP. Com GGPP és el responsable de l'activació post-translacional de la GTPasa RhoA, la disminució de GGPP induïda pel tractament amb simvastatina està relacionada amb la inhibició de RhoA i en conseqüència afecta ROCK. Per corroborar que l'efecte observat de la simvastatina sobre l'expressió de fibulina-2 és a través de la via RhoA/ROCK també hem demostrat que l'AA disminueix l'expressió de fibulina-2 (objectiu 4), ja que

L'activació de la via ROCK per AA com a via alternativa a la inhibició dels isoprenoides està àmpliament descrita^[195, 196]. La subunitat catalítica de ROCK està situada en la part N-terminal de la proteïna i inhibida per un fragment de la part C-terminal. Aquest fragment C-terminal conté el lloc d'unió a RhoA i actua com un autoinhibidor. S'ha demostrat que l'àcid araquidònic s'uneix a la ROCK en la regió auto inhibidora i d'aquesta manera activa la via entre 5 i 6 vegades^[218]. En els nostres resultats es veu que la inducció de la via per AA disminueix l'expressió de fibulina-2 mentre altres àcids grassos (PA,OA,LA,EPA i DHA) que no indueixen la via, no tenen efecte sobre l'expressió de fibulina-2.

La bibliografia publicada en els darrers anys ens ha permès conèixer un ampli ventall d'interaccions de les fibulines amb altres proteïnes de matriu, però encara es coneix molt poc de les seves funcions i de les vies de regulació de la seva expressió. Els nostres resultats descriuen per primer cop l'efecte de les estatines sobre l'expressió de la fibulina-2.

La fibulina-2 té un paper important en la patogènesi de l'aterosclerosi^[43, 119, 121, 219]. En primer lloc la fibulina-2 és crucial no només en la regulació de la migració cel·lular, sinó també en la proliferació i adhesió^[102]. Aquests són processos clau en la patogènesi de l'aterosclerosi. En segon lloc, s'ha demostrat en models murins un augment de l'expressió de fibulin-2 en regions de lesions arterioscleròtiques riques en CML, on està colocalitzada amb versicà i hialurònic^[163]. En tercer lloc, la fibulina-2 està sobre expressada durant la modulació fenotípica de les CML quan les cèl·lules canvien d'un fenotip contràctil (repòs) a un fenotip sintètic (activat). Finalment, s'ha demostrat que fibulina-2 està implicada en el

remodelatge vascular^[163]. Llavors, per l'increment de la fibulina-2, la simvastatina podria afectar la composició, abundància i estructura de la MEC, la qual té implicacions en el procés arterioscleròtic. Per exemple, s'ha demostrat que una disminució del gruix de la capa fibrosa de la placa i la presència de *vasa vasorum* dins de la placa són passos clau en la transformació de les plaques arterioscleròtiques cap a fenotip vulnerable, contribuint d'aquesta manera a l'inici de les complicacions^[220-222]. Considerem que un efecte pleiotròpic important de les estatines es la millora en les característiques que estableixen les plaques arterioscleròtiques^[223-225]. Està descrit un increment significatiu del contingut fibrós de la placa en pacients tractats amb atorvastatina durant un any^[226]. També s'ha demostrat que pacients tractats amb pravastatina tenen plaques amb un augment significatiu del contingut de col·lagen^[183]. A més, l'ús d'estatines durant 9 mesos després d'un infart agut de miocardi incrementa significativament el gruix de la capa fibrosa en pacients hiperlipèmics^[224]. De manera que els nostres resultats podrien indicar que la simvastatina ajudaria a estabilitzar les plaques arterioscleròtiques incrementant la concentració de fibulina-2, afectant per un costat la composició i estructura de la MEC i per un altre millorant la fràgil estructura de la paret vascular dels nous vasos intraplaca. Així, la maduració dels nous vasos intraplaca influeix favorablement en la integritat de la MEC i redueix el risc d'hemorràgia dins de la placa. De la mateixa manera, una estructura de la coberta fibrosa més gruixuda i madura ajuda a estabilitzar la placa arterioscleròtica. Malgrat els nostres resultats suggereixen aquests efectes positius d'un augment de la fibulina-2, s'han de valorar amb cautela

donat que per corroborar-los s'haurien de disposar de resultats en plaques arterioscleròtiques humanes o en animals d'experimentació propensos a arteriosclerosi.

A banda dels efectes beneficiosos de les estatines en les plaques arterioscleròtiques també s'ha demostrat en diferents estudis que l'ús d'aquests fàrmacs disminueix la pressió arterial^[49, 191]. Entre els diferents mecanismes fisiopatològics implicats en l'efecte antihipertensiu de les estatines trobem la reducció d'isoprenoides^[227-229]. Aquestes substàncies tenen la capacitat per modificar diverses proteïnes de membrana (proteïnes G, Rho i d'altres) i al disminuir-les, modifiquen certes senyals i augmenten l'expressió de gens protectors de la ateromatosis i inhibidors de la proliferació de les CML vasculars. Les estatines mitjançant la reducció de la producció d'isoprenoides contribueixen a evitar la hiperplàsia de la capa media de les arterioles de resistència i consegüentment a reduir la HTA i el dany vascular.

Per tant, els SNPs de la FBLN2 que hem trobat associats amb una disminució de la PAS i la odds de HTA esperaríem que produïssin o bé un augment de la proteïna expressada o bé una proteïna amb una funcionalitat millorada. En el cas del SNP de l'exò 2 podria ser el genotip causal donat que el canvi d'un residu d'adenina(A) per un de guanina(G) implica un canvi de l'aminoàcid situat en la posició 361 de la proteïna. Aquest canvi d'una serina (AGC) per una glicina (GGC) podria ser la causa de canvis estructurals i/o funcionals en la proteïna expressada, si tenim en compte resultats d'altres estudis, els quals demostren que canvis

de serina per glicina en altres proteïnes presenten com a resultat canvis en l'afinitat, l'estructura i funció de la proteïna madura^[230], de manera que es necessitarien estudis funcionals per confirmar aquest fet. Per contra, el rs1061376 no implica canvi d'aminoàcid (àcid aspàrtic), aquest polimorfisme és el canvi d'una citosina (C) per timina (T) en la posició 1204. Per tant, al no produir-se cap canvi en l'aminoàcid no seria d'esperar cap correlació amb els canvis en fibulina-2 i la seva funcionalitat. No obstant això, és d'esperar variants funcionals al voltant o en desequilibri d'unió que fossin les causals de l'associació amb la PAS i la HTA.

La fibulina-2 és un important component de la MEC vascular que s'uneix a components de la matriu com són proteoglicans, fibronectina, fibrilina i laminines^[119, 121, 168, 231-233], participant en l'organització i estructura de la paret. Addicionalment, la fibulina-2 pot unir-se a tropoelastina i fibrilina-1 participant en la unió de l'elastina a les microfibrilles^[43, 46, 234]. A més està descrit que la fibulina-2 pot inhibir la migració de les cèl·lules del múscul llis^[29, 163], aquesta propietat de la fibulina-2 concordaria amb l'associació que hem observat del rs3732666 amb la IMT. Els portadors de l'al·lel G expressarien fibulina-2 amb més funcionalitat i aquesta inhibiria la migració de les CML de la media disminuint la IMT.

Per tant, podem postular que variacions en les concentracions de fibulina-2 o un canvi en la seva estructura poden contribuir a

desenvolupar HTA, ja sigui provocant major rigidesa arterial o mitjançant l'alteració de la transducció de senyal cel·lular.

Un canvi en l'estructura de la fibulina-2 originaria una xarxa de fibres elàstiques desorganitzada i com a conseqüència una alteració en l'estructura de la paret vascular que afavoriria la HTA. Els resultats obtinguts estan d'acord amb aquesta hipòtesi, ja que només hem trobat una associació de la fibulina-2 amb la PAS, i al mateix temps la PAS està relacionada amb un augment de la rigidesa vascular central.

Per dur a terme l'estudi dels possibles efectes de fàrmacs relacionats amb el control de la pressió (objectiu 2) s'han escollit el lisinopril i l'amlodipina pels seus efectes sobre la paret arterial. Els nostres experiments han demostrat en HCASMC, que el tractament durant 24h amb lisinopril disminueix l'expressió de fibulina-2 a nivell gènic i proteic i d'altra banda el tractament durant 24h amb amlodipina no afecta l'expressió de les fibulines a les concentracions i temps estudiats. Aquests resultats a priori no eren els esperats, degut a que una disminució de l'angiotensina II produïda pel lisinopril inhibiria RhoA i per tant esperaríem un augment de l'expressió de fibulina-2. Per tant, creiem que el lisinopril disminueix l'expressió de fibulina-2 mitjançant altres mecanismes. Un d'aquests podria ser la inhibició de la degradació de la bradicinina. La bradicinina és una hormona peptídica que indueix la conversió del AA en prostaglandines, particularment en múscul llis vascular i cèl·lules medul·lars renals. Però la veritat que hi ha molt pocs estudis que avaluin la interacció que hi pot haver entre les bradicinines i

Rho, i menys en remodelatge cardiovascular. En cèl·lules epitelials A549 s'ha demostrat que la bradicinina estimula l'activació de NFκB i la síntesis de la interleucina-1β, i que RhoA és necessària i suficient per modular aquest efecte^[235]. En els darrers anys per poder identificar noves dianes terapèutiques s'ha dut a terme una intensa recerca sobre els mecanismes moleculars de la patogènia de la HTA que han demostrat que l'activació del sistema transduccional RhoA/ROCK és un dels nous i principals mecanismes de vasoconstricció en la HTA amb potencial terapèutic^[236]. Les associacions del gen de la FBLN2 amb HTA i la regulació de l'expressió de la proteïna via ROCK activen la investigació sobre la funcionalitat de fibulina-2 sobre aquesta via.

Una limitació que presenta l'estudi genètic de la FBLN2, és que les associacions descrites es refereixen a població caucàsica. Donades les diferències entre les distribucions al·lèliques d'alguns SNPs i la incidència de patir HTA entre els principals grups ètnics, nous estudis en altres poblacions són necessàries per poder generalitzar els nostres resultats. A més, en estudis d'associació la mida de la mostra sempre és un factor a tenir en compte. En el nostre cas la mida de la població de 791 individus, per tant, més estudis en poblacions d'hipertensos i de mida gran serien necessaris per corroborar els nostres resultats.

D'altra banda els resultats dels diferents estudis *in vitro* que descriuen els efectes dels diferents fàrmacs i àcids grassos sobre l'expressió de fibulina-2 són resultats molt robustos. En primer lloc perquè tots els experiments s'han fet en cèl·lules de tres pacients diferents i amb un nombre elevat

d'experiments independents, entre 6 i 12 replicues. També, perquè les HCASMC són cèl·lules que deriven de la túnica íntima i túnica media humana, d'artèries coronàries fibroses lliures de placa, per tant, creiem que aquestes cèl·lules són un model òptim per la investigació de la malaltia de l'artèria coronària. La proliferació del múscul llis de l'íntima i la diferenciació són esdeveniments clau en el desenvolupament d'arteriosclerosi en les artèries coronàries, que condueixen a angina de pit i l'infart de miocardi.

D'altra banda, la manca d'associacions dels SNPs de FBLN1 i 5 amb la HTA, no ens permet descartar aquestes proteïnes com a proteïnes implicades en la fisiopatologia de la HTA. Hi ha prou evidències per pensar que altres SNPs en aquests gens podrien estar associats a aquesta patologia, per exemple, diversos estudis han descrit interaccions de les fibulines-1 i -5^[137, 138] amb la lisil oxidasa, enzim essencial per dur a terme el primer pas de la polimerització de la tropoelastina. Aquest enzim inicia l'ensamblatge covalent de les fibres de col·lagen i l'elastina de la MEC. Un estudi amb ratolins mostra com els *Knock out* de fibulina-5 presenten un increment de la pressió sistòlica i de la pressió de pols respecte als ratolins normals^[29], per tant algun polimorfisme de les fibulines-1 i -5 que afecti l'expressió de la proteïna, podria causar variacions en l'organització de la MEC i d'aquesta manera modular la HTA.

De totes maneres els estudis *in vitro* en HCASMC han mostrat una gran especificitat sobre la fibulina-2 donat que ni la simvastatina, ni el lisinopril, ni la amlodipina ni els diferents àcids grassos han modificat

l'expressió de les fibulines-1, -4 i -5. Aquest fet podria ser degut o bé a que aquestes proteïnes tenen una expressió més constitutiva difícilment regulable a aquest nivell o bé a que el model *in vitro* utilitzat de temps i concentracions no fos l'òptim per investigar els efectes sobre aquestes proteïnes.

En resum, els nostres resultats són la primera evidència de que el gen de la FBLN2 es troba associat a la HTA i que l'expressió de fibulina-2 està regulada per fàrmacs utilitzats com a teràpia preventiva cardiovascular. Així doncs, l'efecte de la simvastatina sobre l'expressió de fibulina-2 podria afegir-se a la llarga llista d'efectes pleiotròpics de les estatines.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

VIII. CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

Tenint en compte els resultats obtinguts en el treball realitzat en aquesta tesi i la discussió dels mateixos, podem extreure una sèrie de conclusions.

Les conclusions extretes són:

- 1- Els SNPs del gen de la FBLN2, rs3732666 (exó2) i rs1061376 (exó18), estan associats a menor PAS i disminució del risc de patir HTA.
- 2- La presència de l'al·lel G en el SNP rs 3732666 està associat a menor IMT en l'artèria caròtida.
- 3- Els SNPs de la FBLN1 i FBLN5 estudiats no han donat associacions amb la HTA.
- 4- La simvastatina augmenta l'expressió gènica i proteica de fibulina-2 en HCASMC.
- 5- La simvastatina regula l'expressió de fibulina-2 a través de la inhibició de la via RhoA/ROCK.
- 6- El lisinopril inhibeix l'expressió de fibulina-2 en HCASMC.
- 7- La amlodipina no produeix canvis en l'expressió de les fibulines-1, -2, -4 i -5.
- 8- L'AA inhibeix l'expressió gènica de la fibulina-2 en HCASMC.
- 9- Els àcids grassos (PA,OA,LA,EPA i DHA) no tenen efecte sobre l'expressió de les fibulines-1, -2, -4 i -5.

Conclusió Final:

La fibulina-2 està associada a la fisiopatologia de la tensió arterial i la seva expressió està regulada per fàrmacs utilitzats en el control preventiu de malalties cardiovasculars.

IX.REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDI GENÈTIC D'ASSOCIACIÓ DE FIBULINES I HIPERTENSIÓ ARTERIAL I REGULACIÓ FARMACOLÒGICA DE LA SEVA

Noemí Serra Encinas

Dipòsit Legal: T 318-2016

1. Pérez, A.E., *Biología de la pared vascular y síndrome metabólico*. Nutrición Hospitalaria, 2005. **XX(1)**(0212-1611): p. 5-17.
2. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
3. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
4. Nabel, E.G., *Cardiovascular disease*. N Engl J Med, 2003. **349**(1): p. 60-72.
5. Ponticos, M. and B.D. Smith, *Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis*. J Biomed Res, 2014. **28**(1): p. 25-39.
6. Sun, D., A. Huang, and G. Kaley, *Mechanical compression elicits NO-dependent increases in coronary flow*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(6): p. H2454-60.
7. Seidemann, S.B., J.K. Lighthouse, and D.M. Greif, *Development and pathologies of the arterial wall*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(11): p. 1977-99.
8. Martinez-Lemus, L.A., *The dynamic structure of arterioles*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. **110**(1): p. 5-11.
9. Barger, A.C., et al., *Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis*. N Engl J Med, 1984. **310**(3): p. 175-7.
10. Khurana, R., et al., *Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia*. Circulation, 2004. **110**(16): p. 2436-43.
11. Moreno, P.R., et al., *Neovascularization in human atherosclerosis*. Curr Mol Med, 2006. **6**(5): p. 457-77.

12. Majesky, M.W., et al., *The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(7): p. 1530-9.
13. Karsdal, M.A., et al., *Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure*. *Assay Drug Dev Technol*, 2013. **11**(2): p. 70-92.
14. Huxley-Jones, J., S.M. Foord, and M.R. Barnes, *Drug discovery in the extracellular matrix*. *Drug Discov Today*, 2008. **13**(15-16): p. 685-94.
15. Bergmeier, W. and R.O. Hynes, *Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(2).
16. Heino, J., *The collagen family members as cell adhesion proteins*. *Bioessays*, 2007. **29**(10): p. 1001-10.
17. Aumailley, M. and N. Smyth, *The role of laminins in basement membrane function*. *J Anat*, 1998. **193 (Pt 1)**: p. 1-21.
18. Timpl, R., et al., *Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(6): p. 479-89.
19. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 423-8.
20. Myllyharju, J. and K.I. Kivirikko, *Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms*. *Trends Genet*, 2004. **20**(1): p. 33-43.
21. Kelleher, C.M., S.E. McLean, and R.P. Mecham, *Vascular extracellular matrix and aortic development*. *Curr Top Dev Biol*, 2004. **62**: p. 153-88.

22. Dingemans, K.P., et al., *Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media*. Anat Rec, 2000. **258**(1): p. 1-14.
23. Kadler, K.E., et al., *Collagen fibril formation*. Biochem J, 1996. **316** (Pt 1): p. 1-11.
24. Wenstrup, R.J., et al., *Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53331-7.
25. Wenstrup, R.J., et al., *Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. col5a1 haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12888-95.
26. Mithieux, S.M. and A.S. Weiss, *Elastin*. Adv Protein Chem, 2005. **70**: p. 437-61.
27. D'Souza, S.E., M.H. Ginsberg, and E.F. Plow, *Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(7): p. 246-50.
28. Kaspar, M., L. Zardi, and D. Neri, *Fibronectin as target for tumor therapy*. Int J Cancer, 2006. **118**(6): p. 1331-9.
29. Cangemi, C., et al., *Fibulins and their role in cardiovascular biology and disease*. Adv Clin Chem, 2014. **67**: p. 245-65.
30. de Vega, S., T. Iwamoto, and Y. Yamada, *Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(11-12): p. 1890-902.
31. Giltay, R., R. Timpl, and G. Kostka, *Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4*. Matrix Biol, 1999. **18**(5): p. 469-80.
32. Yanagishita, M., *Function of proteoglycans in the extracellular matrix*. Acta Pathol Jpn, 1993. **43**(6): p. 283-93.

33. Bock, H.C., et al., *The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9**(7): p. 654-63.
34. Lu, Y.P., et al., *Expression of lumican in human colorectal cancer cells*. Pathol Int, 2002. **52**(8): p. 519-26.
35. Fraser, J.R., T.C. Laurent, and U.B. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med, 1997. **242**(1): p. 27-33.
36. Monfort, J., et al., *Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage site*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(1): p. R26.
37. Wagenseil, J.E. and R.P. Mecham, *Vascular extracellular matrix and arterial mechanics*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 957-89.
38. Gallagher, W.M., C.A. Currid, and L.C. Whelan, *Fibulins and cancer: friend or foe?* Trends Mol Med, 2005. **11**(7): p. 336-40.
39. Rabinovich, G.A., *Galectin-1 as a potential cancer target*. Br J Cancer, 2005. **92**(7): p. 1188-92.
40. Kielty, C.M., M.J. Sherratt, and C.A. Shuttleworth, *Elastic fibres*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2817-28.
41. Roark, E.F., et al., *The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study*. J Histochem Cytochem, 1995. **43**(4): p. 401-11.
42. Kobayashi, N., et al., *A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11805-16.
43. Reinhardt, D.P., et al., *Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19489-96.

44. Nakamura, T., et al., *Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 171-5.
45. Argraves, W.S., et al., *Fibulins: physiological and disease perspectives*. EMBO Rep, 2003. **4**(12): p. 1127-31.
46. Yanagisawa, H. and E.C. Davis, *Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(7): p. 1084-93.
47. Ingber, D.E., *Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?* Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 356-64.
48. Schuppan, D., et al., *Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(3): p. 351-72.
49. Bissell, M.J. and J. Aggeler, *Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression?* Prog Clin Biol Res, 1987. **249**: p. 251-62.
50. Bissell, M.J. and D. Radisky, *Putting tumours in context*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 46-54.
51. Lochter, A. and M.J. Bissell, *An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases*. APMIS, 1999. **107**(1): p. 128-36.
52. Radisky, D.C. and M.J. Bissell, *Cancer. Respect thy neighbor!* Science, 2004. **303**(5659): p. 775-7.
53. Xu, J. and G.P. Shi, *Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(11): p. 2106-2119.
54. Ruiz, P.A. and G. Jarai, *Discoïdin domain receptors regulate the migration of primary human lung fibroblasts through collagen matrices*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**: p. 3.

55. Briet, M., et al., *Arterial stiffness and pulse pressure in CKD and ESRD*. *Kidney Int*, 2012. **82**(4): p. 388-400.
56. Cheung, A.K., et al., *Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 2000. **58**(1): p. 353-62.
57. Schwartz, M.A., *Integrin signaling revisited*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(12): p. 466-70.
58. Cloos, P.A. and S. Christgau, *Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity*. *Biogerontology*, 2004. **5**(3): p. 139-58.
59. Heusch, G., et al., *Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure*. *Lancet*, 2014. **383**(9932): p. 1933-43.
60. Zarins, C.K., et al., *Arterial disruption and remodeling following balloon dilatation*. *Surgery*, 1982. **92**(6): p. 1086-95.
61. Kadar, A. and S. Bjorkerud, *Arterial remodeling following mechanical injury. The role and nature of smooth muscle cells*. *Pathol Res Pract*, 1985. **180**(4): p. 342-7.
62. O'Rourke, M.F., *Arterial aging: pathophysiological principles*. *Vasc Med*, 2007. **12**(4): p. 329-41.
63. Laurent, S., P. Boutouyrie, and P. Lacolley, *Structural and genetic bases of arterial stiffness*. *Hypertension*, 2005. **45**(6): p. 1050-5.
64. Ziemann, S.J., V. Melenovsky, and D.A. Kass, *Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(5): p. 932-43.
65. Booth, A.D., et al., *Inflammation and arterial stiffness in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(2): p. 581-8.
66. Vlachopoulos, C., et al., *Acute systemic inflammation increases arterial stiffness and decreases wave reflections in healthy individuals*. *Circulation*, 2005. **112**(14): p. 2193-200.

67. Roman, M.J., et al., *Arterial stiffness in chronic inflammatory diseases*. Hypertension, 2005. **46**(1): p. 194-9.
68. Maki-Petaja, K.M., et al., *Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse-wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factor-alpha therapy*. Circulation, 2006. **114**(11): p. 1185-92.
69. Amabile, N., et al., *Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3381-8.
70. van Guldener, C., et al., *Endothelium-dependent vasodilatation and distensibility of large arteries in chronic haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12 Suppl 2**: p. 14-8.
71. Zhu, L., et al., *Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 343-9.
72. Lakatta, E.G., *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 490-7.
73. Gibbons, G.H. and V.J. Dzau, *The emerging concept of vascular remodeling*. N Engl J Med, 1994. **330**(20): p. 1431-8.
74. Johnson, C.P., et al., *Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma*. J Clin Pathol, 2001. **54**(2): p. 139-45.
75. Amento, E.P., et al., *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(5): p. 1223-30.
76. Xu, C., et al., *Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2566-72.

77. Lee, A.T. and A. Cerami, *Role of glycation in aging*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **663**: p. 63-70.
78. Bailey, A.J., *Molecular mechanisms of ageing in connective tissues*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(7): p. 735-55.
79. Verzijl, N., et al., *Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39027-31.
80. Winlove, C.P., et al., *Interactions of elastin and aorta with sugars in vitro and their effects on biochemical and physical properties*. Diabetologia, 1996. **39**(10): p. 1131-9.
81. Konova, E., et al., *Age-related changes in the glycation of human aortic elastin*. Exp Gerontol, 2004. **39**(2): p. 249-54.
82. Rojas, A., et al., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. E50-4.
83. Yan, S.D., et al., *Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins*. J Biol Chem, 1994. **269**(13): p. 9889-97.
84. Throckmorton, D.C., et al., *PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products*. Kidney Int, 1995. **48**(1): p. 111-7.
85. Kuzuya, M., et al., *Glycation cross-links inhibit matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells cultured on collagen lattice*. Diabetologia, 2001. **44**(4): p. 433-6.
86. Wendt, T., et al., *Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and vascular inflammation: insights into the pathogenesis of macrovascular complications in diabetes*. Curr Atheroscler Rep, 2002. **4**(3): p. 228-37.
87. Schmidt, A.M. and D. Stern, *Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection*. Curr Atheroscler Rep, 2000. **2**(5): p. 430-6.

88. Stern, D.M., et al., *Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes*. Ageing Res Rev, 2002. **1**(1): p. 1-15.
89. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
90. Lee, R.T., et al., *Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13847-51.
91. Sluijter, J.P., D.P. de Kleijn, and G. Pasterkamp, *Vascular remodeling and protease inhibition--bench to bedside*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 595-603.
92. Nicholls, S.J., et al., *Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2078-87.
93. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
94. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
95. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
96. Faxon, D.P., et al., *Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2617-25.
97. Libby, P. and M. Aikawa, *Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1257-62.

98. McLaughlin, P.J., et al., *Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1700-9.
99. Yanagisawa, H., et al., *Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 168-71.
100. de Vega, S., et al., *TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30878-88.
101. Argraves, W.S., et al., *Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain*. Cell, 1989. **58**(4): p. 623-9.
102. Obaya, A.J., et al., *The dual role of fibulins in tumorigenesis*. Cancer Lett, 2012. **325**(2): p. 132-8.
103. Segade, F., *Molecular evolution of the fibulins: implications on the functionality of the elastic fibulins*. Gene, 2010. **464**(1-2): p. 17-31.
104. Wagenseil, J.E. and R.P. Mecham, *New insights into elastic fiber assembly*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2007. **81**(4): p. 229-40.
105. Vogel, B.E. and E.M. Hedgecock, *Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions*. Development, 2001. **128**(6): p. 883-94.
106. Barth, J.L., et al., *Identification of chicken and C. elegans fibulin-1 homologs and characterization of the C. elegans fibulin-1 gene*. Matrix Biol, 1998. **17**(8-9): p. 635-46.
107. Argraves, W.S., et al., *Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 2): p. 3155-64.

108. Grassel, S., et al., *Mouse fibulin-2 gene. Complete exon-intron organization and promoter characterization*. Eur J Biochem, 1999. **263**(2): p. 471-7.
109. Lecka-Czernik, B., C.K. Lumpkin, Jr., and S. Goldstein, *An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 120-8.
110. Gallagher, W.M., et al., *Human fibulin-4: analysis of its biosynthetic processing and mRNA expression in normal and tumour tissues*. FEBS Lett, 2001. **489**(1): p. 59-66.
111. Korenberg, J.R., et al., *Localization of the human gene for fibulin-1 (FBLN1) to chromosome band 22q13.3*. Cytogenet Cell Genet, 1995. **68**(3-4): p. 192-3.
112. Zhang, H.Y., et al., *Fibulin-1 and fibulin-2 expression during organogenesis in the developing mouse embryo*. Dev Dyn, 1996. **205**(3): p. 348-64.
113. Kluge, M., et al., *Characterization of a novel calcium-binding 90-kDa glycoprotein (BM-90) shared by basement membranes and serum*. Eur J Biochem, 1990. **193**(3): p. 651-9.
114. Kostka, G., et al., *Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(20): p. 7025-34.
115. Cooley, M.A., et al., *Fibulin-1 is required for morphogenesis of neural crest-derived structures*. Dev Biol, 2008. **319**(2): p. 336-45.
116. Zhang, R.Z., et al., *Fibulin-2 (FBLN2): human cDNA sequence, mRNA expression, and mapping of the gene on human and mouse chromosomes*. Genomics, 1994. **22**(2): p. 425-30.

117. Zhang, H.Y., et al., *Extracellular matrix protein fibulin-2 is expressed in the embryonic endocardial cushion tissue and is a prominent component of valves in adult heart*. Dev Biol, 1995. **167**(1): p. 18-26.
118. Tsuda, T., et al., *Fibulin-2 expression marks transformed mesenchymal cells in developing cardiac valves, aortic arch vessels, and coronary vessels*. Dev Dyn, 2001. **222**(1): p. 89-100.
119. Sasaki, T., et al., *Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands*. J Mol Biol, 1995. **254**(5): p. 892-9.
120. Aspberg, A., et al., *Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20444-9.
121. Olin, A.I., et al., *The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1253-61.
122. Ehlermann, J., et al., *Cloning, expression and characterization of the murine Efemp1, a gene mutated in Doyme-Honeycomb retinal dystrophy*. Gene Expr Patterns, 2003. **3**(4): p. 441-7.
123. Wachi, H., et al., *Characterization of the molecular interaction between tropoelastin and DANCE/fibulin-5*. J Biochem, 2008. **143**(5): p. 633-9.
124. Michaelides, M., et al., *Maculopathy due to the R345W substitution in fibulin-3: distinct clinical features, disease variability, and extent of retinal dysfunction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(7): p. 3085-97.
125. Kowal, R.C., et al., *Assignment of fibulin-5 (FBLN5) to human chromosome 14q31 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping*. Cytogenet Cell Genet, 1999. **87**(1-2): p. 2-3.
126. Kowal, R.C., et al., *EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature*. Circ Res, 1999. **84**(10): p. 1166-76.

127. Nakamura, T., et al., *DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22476-83.
128. Chu, M.L. and T. Tsuda, *Fibulins in development and heritable disease*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2004. **72**(1): p. 25-36.
129. Schiemann, W.P., et al., *Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27367-77.
130. Schultz, D.W., et al., *Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(24): p. 3315-23.
131. Schultz, D.W., et al., *HEMICENTIN-1 (FIBULIN-6) and the 1q31 AMD locus in the context of complex disease: review and perspective*. Ophthalmic Genet, 2005. **26**(2): p. 101-5.
132. Cangemi, C., et al., *Fibulin-1 is a marker for arterial extracellular matrix alterations in type 2 diabetes*. Clin Chem, 2011. **57**(11): p. 1556-65.
133. Miner, J.H. and P.D. Yurchenco, *Laminin functions in tissue morphogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 255-84.
134. Timpl, R., et al., *Structure and function of laminin LG modules*. Matrix Biol, 2000. **19**(4): p. 309-17.
135. Sasaki, T., et al., *Structural characterization of two variants of fibulin-1 that differ in nidogen affinity*. J Mol Biol, 1995. **245**(3): p. 241-50.
136. Zheng, Q., et al., *Molecular analysis of fibulin-5 function during de novo synthesis of elastic fibers*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 1083-95.

137. Liu, X., et al., *Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 178-82.
138. Hirai, M., et al., *Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo*. J Cell Biol, 2007. **176**(7): p. 1061-71.
139. Qing, J., et al., *Suppression of anchorage-independent growth and matrigel invasion and delayed tumor formation by elevated expression of fibulin-1D in human fibrosarcoma-derived cell lines*. Oncogene, 1997. **15**(18): p. 2159-68.
140. Twal, W.O., et al., *Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 24): p. 4587-98.
141. Moll, F., et al., *Estrogen induction and overexpression of fibulin-1C mRNA in ovarian cancer cells*. Oncogene, 2002. **21**(7): p. 1097-107.
142. Roger, P., et al., *Increased immunostaining of fibulin-1, an estrogen-regulated protein in the stroma of human ovarian epithelial tumors*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1579-88.
143. Forti, S., et al., *Identification of breast cancer-restricted antigens by antibody screening of SKBR3 cDNA library using a preselected patient's serum*. Breast Cancer Res Treat, 2002. **73**(3): p. 245-56.
144. Greene, L.M., et al., *Elevated expression and altered processing of fibulin-1 protein in human breast cancer*. Br J Cancer, 2003. **88**(6): p. 871-8.
145. Pupa, S.M., et al., *Immunological and pathobiological roles of fibulin-1 in breast cancer*. Oncogene, 2004. **23**(12): p. 2153-60.
146. Brooke, J.S., J.H. Cha, and L. Eidels, *Latent transforming growth factor beta-binding protein-3 and fibulin-1C interact with the extracellular domain of the heparin-binding EGF-like growth factor precursor*. BMC Cell Biol, 2002. **3**: p. 2.

147. Albig, A.R., J.R. Neil, and W.P. Schiemann, *Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2621-9.
148. Hwang, C.F., et al., *Fibulin-3 is associated with tumour progression and a poor prognosis in nasopharyngeal carcinomas and inhibits cell migration and invasion via suppressed AKT activity*. J Pathol, 2010. **222**(4): p. 367-79.
149. Lee, Y.H., et al., *Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism*. Carcinogenesis, 2008. **29**(12): p. 2243-51.
150. Ohara, H., et al., *Stage-specific roles of fibulin-5 during oxidative stress-induced renal carcinogenesis in rats*. Free Radic Res, 2011. **45**(2): p. 211-20.
151. Schluterman, M.K., et al., *Loss of fibulin-5 binding to beta1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS*. Dis Model Mech, 2010. **3**(5-6): p. 333-42.
152. Yue, W., et al., *Fibulin-5 suppresses lung cancer invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-7 expression*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6339-46.
153. Albig, A.R. and W.P. Schiemann, *Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells*. DNA Cell Biol, 2004. **23**(6): p. 367-79.
154. Sullivan, K.M., et al., *Fibulin-5 functions as an endogenous angiogenesis inhibitor*. Lab Invest, 2007. **87**(8): p. 818-27.
155. Kuang, P.P., et al., *Fibulin-5 gene expression in human lung fibroblasts is regulated by TGF-beta and phosphatidylinositol 3-kinase activity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1412-21.

156. Girona, J., et al., *FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway*. PLoS One, 2013 Nov 29;8(11).
157. Huchtagowder, V., et al., *Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome*. Am J Hum Genet, 2006. **78**(6): p. 1075-80.
158. Kappanayil, M., et al., *Characterization of a distinct lethal arteriopathy syndrome in twenty-two infants associated with an identical, novel mutation in FBLN4 gene, confirms fibulin-4 as a critical determinant of human vascular elastogenesis*. Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 61.
159. Loeys, B., et al., *Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(18): p. 2113-8.
160. Claus, S., et al., *A p.C217R mutation in fibulin-5 from cutis laxa patients is associated with incomplete extracellular matrix formation in a skin equivalent model*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(6): p. 1442-50.
161. Lotery, A.J., et al., *Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa*. Hum Mutat, 2006. **27**(6): p. 568-74.
162. Hopf, M., et al., *Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin*. Eur J Biochem, 1999. **259**(3): p. 917-25.
163. Strom, A., et al., *Fibulin-2 is present in murine vascular lesions and is important for smooth muscle cell migration*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 755-63.
164. Zhang, H., et al., *Fibulin-2 deficiency attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by reducing transforming growth factor-beta signalling*. Clin Sci (Lond), 2014. **126**(4): p. 275-88.

165. Tsuda, T., et al., *Loss of fibulin-2 protects against progressive ventricular dysfunction after myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(1): p. 273-82.
166. Sicot, F.X., et al., *Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(3): p. 1061-7.
167. Ramaswamy, S., et al., *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 49-54.
168. Yi, C.H., et al., *Loss of fibulin-2 expression is associated with breast cancer progression*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1535-45.
169. Alcendor, D.J., et al., *KSHV regulation of fibulin-2 in Kaposi's sarcoma: implications for tumorigenesis*. Am J Pathol, 2011. **179**(3): p. 1443-54.
170. Law, E.W., et al., *Anti-angiogenic and tumor-suppressive roles of candidate tumor-suppressor gene, Fibulin-2, in nasopharyngeal carcinoma*. Oncogene, 2012. **31**(6): p. 728-38.
171. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
172. Assmann, G., P. Cullen, and H. Schulte, *The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years*. Eur Heart J, 1998. **19 Suppl A**: p. A2-11.
173. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
174. Sacks, F.M., et al., *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators*. N Engl J Med, 1996. **335**(14): p. 1001-9.

175. *Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group.* N Engl J Med, 1998. **339**(19): p. 1349-57.
176. Shepherd, J., et al., *Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group.* N Engl J Med, 1995. **333**(20): p. 1301-7.
177. Downs, J.R., et al., *Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study.* JAMA, 1998. **279**(20): p. 1615-22.
178. *Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients.* BMJ, 2002. **324**(7329): p. 71-86.
179. Hoeg, J.M. and H.B. Brewer, Jr., *3-Hydroxy-3-methylglutaryl--coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia.* JAMA, 1987. **258**(24): p. 3532-6.
180. Endres, M. and U. Laufs, *Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms.* Stroke, 2004. **35**(11 Suppl 1): p. 2708-11.
181. Endres, M., et al., *Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8880-5.
182. Holschermann, H., et al., *Statins prevent NF-kappaB transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells.* Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 240-5.
183. Nissen, S.E., et al., *Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial.* JAMA, 2004. **291**(9): p. 1071-80.

184. Blum, A. and R. Shamburek, *The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis*. Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 325-30.
185. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, *Rho GTPases and signaling networks*. Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
186. Liao, J.K., *Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 285-8.
187. Kaibuchi, K., S. Kuroda, and M. Amano, *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 459-86.
188. Aspenstrom, P., *Effectors for the Rho GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(1): p. 95-102.
189. Vojtek, A.B. and C.J. Der, *Increasing complexity of the Ras signaling pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 19925-8.
190. Laufs, U., et al., *3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1)*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21926-31.
191. Loirand, G. and P. Pacaud, *The role of Rho protein signaling in hypertension*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(11): p. 637-47.
192. Seko, T., et al., *Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle*. Circ Res, 2003. **92**(4): p. 411-8.
193. Guilluy, C., et al., *The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure*. Nat Med, 2010. **16**(2): p. 183-90.
194. Wesselman, J.P. and J.G. De Mey, *Angiotensin and cytoskeletal proteins: role in vascular remodeling*. Curr Hypertens Rep, 2002. **4**(1): p. 63-70.

195. Garcia, M.C., et al., *Arachidonic acid stimulates formation of a novel complex containing nucleolin and RhoA*. FEBS Lett, 2011. **585**(4): p. 618-22.
196. Brown, M., et al., *Arachidonic acid induction of Rho-mediated transendothelial migration in prostate cancer*. Br J Cancer, 2014. **110**(8): p. 2099-108.
197. Havlik, R.J., et al., *Blood pressure aggregation in families*. Am J Epidemiol, 1979. **110**(3): p. 304-12.
198. Appel, L.J., et al., *A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure*. DASH Collaborative Research Group. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1117-24.
199. Stevens, V.J., et al., *Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II*. Ann Intern Med, 2001. **134**(1): p. 1-11.
200. Dumler, F., *Dietary sodium intake and arterial blood pressure*. J Ren Nutr, 2009. **19**(1): p. 57-60.
201. Burke, A.P., et al., *Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims*. Z Kardiol, 2000. **89 Suppl 2**: p. 49-53.
202. Edmonds, M.E., et al., *Medial arterial calcification and diabetic neuropathy*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **284**(6320): p. 928-30.
203. Mikhaylova, L., J. Malmquist, and M. Nurminskaya, *Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a*. Calcif Tissue Int, 2007. **81**(5): p. 372-81.
204. Argraves, W.S., et al., *Fibulin-1 and fibrinogen in human atherosclerotic lesions*. Histochem Cell Biol, 2009. **132**(5): p. 559-65.
205. Durier, S., et al., *Physiological genomics of human arteries: quantitative relationship between gene expression and arterial stiffness*. Circulation, 2003. **108**(15): p. 1845-51.

206. Cheuk, B.L. and S.W. Cheng, *Differential expression of elastin assembly genes in patients with Stanford Type A aortic dissection using microarray analysis*. J Vasc Surg, 2011. **53**(4): p. 1071-1078 e2.
207. Mohamed, S.A., et al., *Pathway analysis of differentially expressed genes in patients with acute aortic dissection*. Biomark Insights, 2009. **4**: p. 81-90.
208. Hanada, K., et al., *Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice*. Circ Res, 2007. **100**(5): p. 738-46.
209. Wang, X., et al., *Decreased expression of fibulin-5 correlates with reduced elastin in thoracic aortic dissection*. Surgery, 2005. **138**(2): p. 352-9.
210. Nakamura, T., et al., *Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration*. Clin Chim Acta, 1998. **276**(2): p. 173-7.
211. Sundstrom, J., et al., *Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study*. Eur Heart J, 2004. **25**(17): p. 1509-16.
212. Aragoncillo, P., et al., *The protective role of atorvastatin on function, structure and ultrastructure in the aorta of dyslipidemic rabbits*. Virchows Arch, 2000. **437**(5): p. 545-54.
213. Maeso, R., et al., *Effect of atorvastatin on endothelium-dependent constrictor factors in dyslipidemic rabbits*. Gen Pharmacol, 2000. **34**(4): p. 263-72.
214. Rosenson, R.S. and C.C. Tangney, *Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction*. JAMA, 1998. **279**(20): p. 1643-50.
215. Ashida, T., *[Treatment of hypertension with dyslipidemia]*. Nihon Rinsho, 2001. **59**(5): p. 978-82.

- 216. Washio, M., et al., *Role of hypertension, dyslipidemia and diabetes mellitus in the development of coronary atherosclerosis in Japan*. Jpn Circ J, 2001. **65**(8): p. 731-7.
- 217. Rodriguez, J.A., J. Orbe, and J.A. Paramo, *[Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes]*. Rev Esp Cardiol, 2007. **60**(9): p. 959-67.
- 218. Araki, S., et al., *Arachidonic acid-induced Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase*. Pflugers Arch, 2001. **441**(5): p. 596-603.
- 219. Utani, A., M. Nomizu, and Y. Yamada, *Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2814-20.
- 220. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1807-16.
- 221. Schaar, J.A., et al., *Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece*. Eur Heart J, 2004. **25**(12): p. 1077-82.
- 222. ten Kate, G.L., et al., *Noninvasive imaging of the vulnerable atherosclerotic plaque*. Curr Probl Cardiol, 2010. **35**(11): p. 556-91.
- 223. Nakamura, T., et al., *Rapid stabilization of vulnerable carotid plaque within 1 month of pitavastatin treatment in patients with acute coronary syndrome*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **51**(4): p. 365-71.
- 224. Takarada, S., et al., *Effect of statin therapy on coronary fibrous-cap thickness in patients with acute coronary syndrome: assessment by optical coherence tomography study*. Atherosclerosis, 2009. **202**(2): p. 491-7.
- 225. Hattori, K., et al., *Impact of statin therapy on plaque characteristics as assessed by serial OCT, grayscale and integrated backscatter-IVUS*. JACC Cardiovasc Imaging, 2012. **5**(2): p. 169-77.

226. Crisby, M., et al., *Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization*. *Circulation*, 2001. **103**(7): p. 926-33.
227. Birnbaum, Y. and Y. Ye, *Pleiotropic effects of statins: the role of eicosanoid production*. *Curr Atheroscler Rep*, 2012. **14**(2): p. 135-9.
228. Davignon, J., *Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins*. *Circulation*, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III39-43.
229. Ruperez, M., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways*. *Hypertension*, 2007. **50**(2): p. 377-83.
230. Giroux, M.J. and C.F. Morris, *Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6262-6.
231. Longmate, W.M., et al., *Reduced fibulin-2 contributes to loss of basement membrane integrity and skin blistering in mice lacking integrin alpha3beta1 in the epidermis*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(6): p. 1609-17.
232. Sasaki, T., et al., *Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix*. *J Cell Sci*, 1996. **109** (Pt 12): p. 2895-904.
233. Gu, Y.C., et al., *Association of extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 with fibronectin in bone marrow stroma*. *Br J Haematol*, 2000. **109**(2): p. 305-13.
234. Papke, C.L. and H. Yanagisawa, *Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies*. *Matrix Biol*, 2014. **37**: p. 142-9.

- 235. Pan, Z.K., et al., *Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1beta gene expression in cultured human epithelial cells*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 3038-45.

- 236. Johns, D.G., et al., *Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension*. J Biomed Sci, 2000. **7**(6): p. 431-43.